

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



PROGRAMA DE POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS
ASOCIADAS AL ERIZO DE MAR *Strongylocentrotus* spp EN EL INTERMAREAL
ROCOSO Y EFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO EN LA RESPUESTA METAMÓRFICA**

Tesis que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

LEOPOLDO DÍAZ PÉREZ

Ensenada, Baja California, México

Noviembre 2011

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

**VARIACION ESPACIO-TEMPORAL DE LAS POBLACIONES
BACTERIANAS ASOCIADAS AL ERIZO DE MAR *Strongylocentrotus*
spp. EN EL INTERMAREAL ROCOSO Y EFECTO DEL ESTRÉS
TÉRMICO EN LA RESPUESTA METAMÓRFICA**

T E S I S

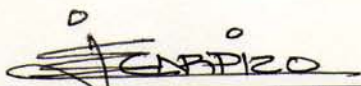
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Leopoldo Díaz Pérez

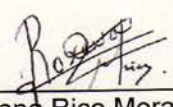
Aprobada por:



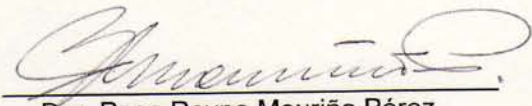
Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Director de tesis



Dr. Martín Hernández Ayón
Sinodal



Dra. Roxana Rico Mora
Sinodal



Dra. Rosa Reyna Mouríño Pérez
Sinodal



Dra. Gabriela Montaña Moctezuma
Sinodal

Dedicatoria

A mi familia, mis padres mis hermanas,
que siempre me brindaron todo su apoyo,
y siempre me alentaron a seguir adelante.

Muchas gracias por todo,

Los amo.

Agradecimientos

Al Dr. Eugenio Carpizo, por todo su apoyo, confianza, enseñanza y sobretodo la amistad que me ha brindado durante esta gran travesía que inicio desde el 2006. Gracias por compartir tú tiempo y conocimientos conmigo. Ha sido un placer y un honor haber trabajado contigo, y estoy seguro que de aquí en adelante vendrán nuevos proyecto y nuevos vinos que probar. Muchas gracias!!!.

A la Dra. Roxana Rico, por siempre brindarme su apoyo y amistad durante todos estos años que hemos trabajado juntos. Muchas gracias por todos tus consejos durante la realización de mi doctorado y sobretodo porque siempre me brindaste tu tiempo en los momentos que tenía algún tropezón en mi investigación. Muchas gracias Rox!!!

A la Dra. Rosa Mouriño, por todos tus comentarios valiosos sobre el desarrollo de mi investigación que enriquecieron mucho este trabajo. Porque siempre que iba a verte siempre tenías tiempo para recibirme y charlar sobre mi proyecto y muchas cosas más. Muchas gracias por tu amistad!!.

Al Dr. Martin Hernández, por todo tu apoyo y tiempo dedicado al seguimiento de mi proyecto. Gracias por todos tus atinados comentarios, los cuales fueron un gran aporte para el desarrollo de esta investigación. Muchas gracias por todo!!.

A la Dra. Gabriela Montaña, por aceptar ser parte de mi comité y por todos los comentarios realizados a este proyecto, los cuales enriquecen más esta investigación. Muchas gracias por todo y por tu amistad!!.

Al M.C Roberto Escobar, por su amistad durante todos estos años y por todo su apoyo logístico en las salidas de campo para que se pudiera llevar a cabo esta investigación. Muchas gracias por todo Roberto.

Al Dr. Enrique Valenzuela y al Oc. Filiberto que siempre me brindaron su apoyo para la obtención de la microalgas para alimentar a los erizos, lo cual fue algo fundamental para que este proyecto pudiera llevarse a cabo y gracias por todas las facilidades que me brindaron para mantener mis cultivos. Gracias!!.

Al Oc. Luis Aguilar y Raul Aguilar (q.e.p.d) que siempre me brindaron su apoyo para la identificación de algas coralinas de las cuales obtuve muestras bacterianas, fundamentales para este proyecto. Muchas gracias.

A Esmeralda que siempre me ha brindado su apoyo y amor incondicional durante todo este tiempo y por apoyarme en los momentos más difíciles. Te Amo.

A todos mis compañeros del laboratorio: Paola, Raquel, Carlos, Dora, Tatiana, Luvia por su amistad y su ayuda incondicional durante la realización de este proyecto. Extrañare los cafecitos y galletas en las horas de descanso.

A todos los estudiantes de licenciatura de Biología y Oceanología por todo el apoyo brindado para el mantenimiento de larvas y cepas bacterianas. A Miriam, Ale, Norma, Aime, Luis, Cesar, Angel y la lista es interminable. Muchas gracias ya que sin ustedes no sé si hubiera terminado mi doctorado algún día.

A todas aquellas personas que me brindaron su apoyo y participaron de manera directa o indirecta durante el desarrollo de mi investigación.

A todos los profesores, directivos, secretarías de la Facultad de Ciencias Marinas y del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, por todo su apoyo durante todos estos años.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, mediante los recursos otorgados por el CONACyT de la beca de doctorado No. 206520.

Resumen

En la presente investigación, se realizó una caracterización de las comunidades bacterianas heterótrofas cultivables asociadas a las poblaciones de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, con el objetivo de determinar el grado de variación espacial y temporal en la composición de géneros y perfiles metabólicos de bacterias aisladas de diferentes sustratos, en dos localidades en el estado de Baja California, con el potencial de inducir a la metamorfosis a las larvas de erizo morado, mediante la generación de señales ambientales. Así mismo, se realizaron estudios para determinar la respuesta fisiológica de larvas en estadios tardíos de *S. purpuratus* y erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* ante condiciones de estrés térmico, mediante la determinación de los límites de tolerancia térmica, así como su supervivencia y retraso de la metamorfosis en condiciones experimentadas en el océano y condiciones extremas. Lo anterior con el objetivo de entender la capacidad de ambas especies ante condiciones de estrés ambiental, particularmente asociadas con el intermareal rocoso y en respuesta a eventos de cambio oceánico como a Oscilación del Sur El Niño” (ENSO) e incrementos de temperatura a consecuencia del cambio climático global.

Los resultados mostraron que las comunidades bacterianas heterótrofas cultivables varían espacial y temporalmente en cuanto a la composición de géneros y perfiles metabólicos para cada una de las localidades. Sin embargo las comunidades bacterianas de erizo morado y algas coralinas de la localidad de Punta Baja presentaron una mayor similitud entre sí que en relación con el resto de los sustratos, en donde los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* son parte fundamental de las comunidades bacterianas, los cuales fueron constantes temporalmente e importantes para inducir a la metamorfosis a larvas de erizo morado en condiciones de laboratorio. Por otro lado, se determinó que las larvas en estadios tardíos de desarrollo de *S. franciscanus* y *S. purpuratus*, presentan una alta termotolerancia al estrés térmico. Así mismo, se determinó que temperaturas alrededor de los 27°C en periodos de tiempo cortos (horas) pueden comprometer el inicio de la metamorfosis prologando la etapa larval en ambas especies. Esto puede tener algún efecto en el asentamiento y los patrones de reclutamiento del erizo morado y erizo rojo y por lo tanto en la dinámica poblacional de ambas especies.

Índice

	Página
Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Resumen.....	iv
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tablas.....	xi
Capítulo 1: Introducción General.....	1
1.1 El papel de las bacterias en el asentamiento e inducción a la metamorfosis en larvas de invertebrados marinos.....	1
1.2 Aspectos biológicos del erizo morado y erizo rojo.....	2
1.3 Condiciones oceanográficas en Baja California.....	3
1.4 Anomalías térmicas y cambio climático.....	6
1.5 Planteamiento del problema y estructura de la tesis.....	8
Objetivo general y objetivos particulares.....	10
Capítulo 2: Variación espacio-temporal de las comunidades bacterianas asociadas a las poblaciones de erizo morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> en el intermareal rocoso y su efecto en la inducción a la metamorfosis.....	11
2.1 Introducción.....	11
2.2 Metodología.....	13
2.3 Resultados.....	25
2.4 Discusión.....	86
2.4.4 Conclusiones.....	100
Capítulo 3: Efecto del estrés térmico en estadios larvales tardíos en dos especies de erizo <i>Strongylocentrotus</i> spp.: Límite de tolerancia térmica, retraso de la metamorfosis y supervivencia post-metamórfica.....	102
3.1 Introducción.....	102
3.2 Metodología.....	104
3.3 Resultados.....	110
3.4 Discusión.....	136
3.5 Conclusión.....	142
Apéndice I.....	143
Apéndice II.....	148
Anexo I: Protocolos de bacteriología.....	156
Anexo II: Protocolos de biología molecular.....	161
Literatura Citada.....	164

Lista de Figuras

Figura		Pagina
1	Mapa del sistema de la Corriente de California.....	4
2	Zonas de surgencias frecuentes a lo largo de la Península de Baja California, México.....	5
3	Diagrama de eventos de surgencias.....	6
4	Eventos de El Niño y La Niña.....	7
5	Localización de los sitios de muestreo en el municipio de Ensenada, Baja California, México.....	14
6	Esquematación del sitio de muestreo en Punta Baja en condición de marea baja.....	15
7	Metodología desarrollada para el aislamiento de bacterias recolectadas en el campo.....	17
8	Características morfológicas de las colonias bacterianas consideradas para su aislamiento y purificación.....	17
9	Purificación de colonias mediante estriado en placa.....	18
10	Características morfológicas de bacterias aisladas de Punta Baja y Playa Esmeralda.....	26
11	Porcentaje del total de las cepas bacterianas que mostraron crecimiento positivo para las distintas pruebas bioquímicas (Punta Baja).....	27
12	Porcentaje de bacterias que crecieron en medio TCBS y MacConkey (Punta Baja).....	28
13	Porcentaje del total de las cepas bacterianas que mostraron crecimiento positivo para las distintas pruebas bioquímicas (Playa Esmeralda).....	29
14	Porcentaje de bacterias que crecieron en medio TCBS y MacConkey (Playa Esmeralda).....	30
15	Purificación de DNA genómico bacteriano.....	31
16	Amplificación del gen ribosomal 16S mediante PCR.....	31
17	Purificación de productos de PCR.....	32
18	Árbol filogenético del gen 16S de secuencias entre 100 y 200pb (Punta Baja).....	35
19	Árbol filogenético del gen 16S de secuencias entre 200 y 300pb (Punta Baja).....	36
20	Árbol filogenético del gen 16S de secuencias entre 300 y 400pb (Punta Baja).....	37
21	Árbol filogenético del gen 16S de secuencias entre 450 y 550pb (Punta Baja).....	38
22	Árbol filogenético del gen 16S de secuencias entre 260 y 350pb (Playa Esmeralda).....	39
23	Árbol filogenético del gen 16S de secuencias entre 500 y 600pb (Playa Esmeralda).....	40
24	Árbol filogenético del gen 16S de secuencias entre 700 y 750pb (Playa Esmeralda).....	41
25	Proporción de géneros bacterianos de Punta Baja.....	42
26	Proporción de géneros bacterianos de Playa Esmeralda.....	43
27	Análisis espacial de la diversidad de géneros bacterianos representado en MDS	

	mediante el coeficiente de similitud de Jaccard, muestras 2007-2008 Punta Baja.....	44
28	Análisis espacial de la diversidad de géneros bacterianos representado en MDS mediante el coeficiente de similitud de Jaccard, muestras 2009-2010 Punta Baja.....	46
29	Análisis temporal de la diversidad de géneros bacterianos representado en MDS mediante el coeficiente de similitud de Jaccard, muestras 2007, 2008, 2009 y 2010 Punta Baja.....	48
30	Análisis temporal de la diversidad de géneros bacterianos representado en MDS mediante el coeficiente de similitud de Jaccard, muestras 2007, 2008, 2009 y 2010 Punta Baja.....	50
31	Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de <i>S. purpuratus</i> en la localidad de Punta Baja del 2007 al 2010.....	52
32	Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de <i>C. vancouverensis</i> en la localidad de Punta Baja del 2007 al 2010.....	53
33	Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de agua de mar en la localidad de Punta Baja del 2008 al 2010.....	54
34	Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de <i>M. californianus</i> en la localidad de Punta Baja del 2007 y 2009.....	55
35	Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de <i>B. orbigniana</i> en la localidad de Punta Baja del 2008 y 2009.....	55
36	Análisis de la diversidad de géneros bacterianos representado en cladograma mediante el coeficiente de similitud de Jaccard de Playa Esmeralda.....	57
37	Análisis de diversidad de géneros bacterianos representado en MDS mediante el coeficiente de similitud de Jaccard, Playa Esmeralda del 2008 al 2010.....	58
38	Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de <i>A. incisa</i> en la localidad de Playa Esmeralda del 2008 al 2010.....	59
39	Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de <i>C. vancouverensis</i> en la localidad de Playa Esmeralda del 2008 al 2010.....	60
40	Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de agua de mar en la localidad de Playa Esmeralda del 2008 al 2010.....	61
41	Análisis de la diversidad de géneros bacterianos representados en MDS de las localidades de Punta Baja y Playa Esmeralda entre el 2007 y 2010.....	62
42	Análisis de la diversidad de géneros bacterianos representados en MDS de las localidades de Punta Baja y Playa Esmeralda entre el 2008 y 2010.....	63
43	Análisis espacial representado en MDS de las características metabólicas de bacterias aisladas de Punta Baja en 2008.....	65
44	Análisis espacial representado en MDS de las características metabólicas de bacterias aisladas de Punta Baja en 2009.....	67
45	Análisis espacial representado en MDS de las características metabólicas de bacterias aisladas de Punta Baja en 2010.....	70
46	Análisis temporal representado en MDS de las características metabólicas de bacterias aisladas de Punta Baja del 2008 al 2010.....	73
47	Análisis temporal representado en MDS de las características metabólicas de bacterias aisladas de Punta Baja del 2007, 2008 y 2010.....	74
48	Análisis espacial representado en MDS de las características metabólicas de	

	bacterias aisladas de Playa Esmeralda del 2008 al 2010.....	76
49	Análisis temporal representado en MDS de las características metabólicas de bacterias aisladas de Playa Esmeralda del 2008 al 2010.....	78
50	Análisis temporal representado en MDS de las características metabólicas de bacterias aisladas de Punta Baja y Playa Esmeralda del 2008	79
51	Análisis temporal representado en MDS de las características metabólicas de bacterias aisladas de Punta Baja y Playa Esmeralda del 2009	80
52	Análisis temporal representado en MDS de las características metabólicas de bacterias aisladas de Punta Baja y Playa Esmeralda del 2010	82
53	Porcentaje de inducción a la metamorfosis de larvas competentes de <i>S. purpuratus</i> con películas bacterianas mono-específicas.....	84
54	Postlarva recién metamorfoseado de erizo morado <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> y metamorfosis incompleta.....	108
55	Efecto de la temperatura en la supervivencia de larvas precompetentes y competentes de erizo morado.....	111
56	Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis de <i>S. purpuratus</i> sometidas a estrés térmico por 30 minutos.....	113
57	Porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis y porcentaje de supervivencia total de larvas de erizo morado sujetas a estrés térmico por 30 minutos.....	114
58	Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis en larvas de erizo morado aclimatadas por 30 minutos a 20°C y sujetas a estrés térmico por 30 minutos.....	116
59	Porcentaje de supervivencia de larvas de erizo morado que iniciaron la metamorfosis y porcentaje de supervivencia total de larvas aclimatadas a 20°C y sujetas a estrés térmico por 30 minutos.....	117
60	Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis de <i>S. purpuratus</i> sometidas a estrés térmico por 4 horas.....	119
61	Porcentaje de supervivencia de larvas de erizo morado que iniciaron la metamorfosis y porcentaje de supervivencia total de larvas sujetas a estrés térmico por 4 horas.....	121
62	Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis de <i>S. purpuratus</i> sometidas a estrés térmico por 6 horas.....	123
63	Porcentaje de supervivencia de larvas de erizo morado que iniciaron la metamorfosis y porcentaje de supervivencia total de larvas sujetas a estrés térmico por 6 horas.....	124
64	Límite de tolerancia térmica de erizo rojo <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> sujetos a diferentes tratamientos térmicos.....	125
65	Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis en larvas de erizo rojo aclimatadas por 24 horas a 20 y 23°C y sujetas a estrés térmico por 2 horas.....	127
66	Porcentaje de supervivencia de larvas de erizo rojo que iniciaron la metamorfosis y porcentaje de supervivencia total de larvas aclimatadas a 20 y 23°C y sujetas a estrés térmico por 2 horas.....	128
67	Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis de <i>S. franciscanus</i>	

	sometidas a estrés térmico por 3 horas.....	130
68	Porcentaje de supervivencia de larvas de <i>S. franciscanus</i> que iniciaron la metamorfosis y porcentaje de supervivencia total de larvas sujetas a estrés térmico por 3 horas.....	131
69	Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis de <i>S. franciscanus</i> sometidas a estrés térmico por 6 horas.....	133
70	Porcentaje de supervivencia de larvas de <i>S. franciscanus</i> que iniciaron la metamorfosis y porcentaje de supervivencia total de larvas sujetas a estrés térmico por 6 horas.....	135
71	Variación de la temperatura en el intermareal rocoso en intervalos de marea en Punta Baja, Baja California, México.....	137
72	Clúster de porcentajes de similitud de pruebas bioquímicas de bacterias aisladas de Punta Baja, grupos metabólicos del 1 al 5.....	143
73	Clúster de porcentajes de similitud de pruebas bioquímicas de bacterias aisladas de Punta Baja, grupos metabólicos del 6 al 11.....	144
74	Clúster de porcentajes de similitud de pruebas bioquímicas de bacterias aisladas de Punta Baja, grupos metabólicos del 12 al 15.....	145
75	Clúster de porcentajes de similitud de pruebas bioquímicas de bacterias aisladas de Punta Baja, grupos metabólicos 16 y 17.....	146
76	Clúster de porcentajes de similitud de pruebas bioquímicas de bacterias aisladas de Playa Esmeralda, grupos metabólicos del 1 al 10.....	147

Lista de Tablas

Tabla		Pagina
1	Recolecta de muestras bacterianas.....	13
2	Pruebas bioquímicas básicas utilizadas para la identificación de las cepas bacterianas aisladas de los sitios de muestreo.....	19
3	Grupos de separación de secuencias por tamaños para su alineación por BLAST, secuencias amplificadas con el primer 8F.....	33
4	Grupos de separación de secuencias por tamaños para su alineación por BLAST, secuencias amplificadas con el primer 785R.....	34
5	Grupos metabólicos de bacterias aisladas de la localidad de Punta Baja entre 2007 y 2010.....	148
6	Grupos metabólicos de bacterias aisladas de la localidad de Playa Esmeralda entre 2008 y 2010.....	153

Capítulo 1. Introducción General

1.1 El papel de las bacterias en el asentamiento e inducción a la metamorfosis en larvas de invertebrados marinos

Una gran diversidad de invertebrados marinos presentan formas larvales durante su ciclo de vida, en donde los eventos de asentamiento y metamorfosis son claves para el reclutamiento y dinámica poblacional de sus poblaciones adultas (Jackson *et al.* 2002). Se ha documentado que las larvas de invertebrados marinos llevan a cabo el asentamiento y metamorfosis mediante la detección de señales ambientales, en sustratos que cumplen con las condiciones necesarias para su crecimiento y supervivencia. Estas señales ambientales pueden ser físicas (luz, temperatura, etc) o químicas de origen biológico (Hadfield y Paul, 2001; Pineda y López, 2002). Diversos estudios han demostrado que las señales ambientales de origen químico pueden ser producidas por diferentes organismos, como algas marinas (Suenaga *et al.* 2004; Swanson *et al.* 2004), conoespecíficos (Toonen y Pawlink, 2001) y comunidades bacterianas las cuales forman biopelículas en cualquier superficie en el océano (Lau y Qian, 2001; Huggett *et al.*, 2006).

Las comunidades bacterianas (biopelículas) son sistemas dinámicos que presentan heterogeneidad espacial y temporal en cuanto a su composición de grupos bacterianos, dependiendo de las condiciones ambientales (Shikuma y Hadfield, 2006). Así mismo, en los últimos años se ha demostrado que las comunidades bacterianas asociadas a superficies marinas, generan compuestos metabólicos secundarios como: glicoproteínas, aminoácidos, polisacáridos, entre otros (Hadfield y Paul, 2001; Harder *et al.* 2002; Swanson *et al.* 2006), los cuales sirven como señales ambientales para inducir el asentamiento y la metamorfosis en larvas de invertebrados marinos, para la selección de sitios adecuados para su crecimiento y supervivencia (Chiu *et al.* 2007; Huang *et al.* 2007; Dworjanyn *et al.* 2008; Hadfield, 2011). Lo anterior ha sido determinado para una gran variedad de invertebrados marinos como corales (Webster *et al.* 2004), esponjas (Whalan *et al.* 2008), poliquetos (Hadfield, 2011), equinodermos (Díaz-Pérez, 2006; Dworjanyn y Pirozzi, 2008; Santiago-González, 2008), briozoarios (Drobtsov y Qian 2006), moluscos (Gribben *et al.* 2009; Yu *et al.* 2010) y crustáceos (Khandeparker *et al.* 2006; Anderson y Epifanio, 2009).

La composición de grupos bacterianos en una biopelícula depende de las condiciones ambientales en las que se encuentre y por lo tanto, el efecto de las comunidades bacterianas en el asentamiento y metamorfosis larval está en función de la composición de especies bacterianas (Lau y Qian, 1997; Rodríguez y Epifanio 2000; Díaz-Pérez, 2006), es decir, las larvas tienen la capacidad de distinguir entre biopelículas desarrolladas en diferentes sustratos y condiciones ambientales, para asentarse y metamorfosearse en aquellos sitios relevantes para el hábitat de sus conespecíficos adultos (Pearce y Scheibling, 1991; Qian *et al.* 2003). Lo anterior ha sido documentado para el poliqueto *Hydroides elegans* (Hadfield, 2011), los balanos *Balanus amphitrite* (Qian *et al.* 2003), *Balanus trigonus* (Lau *et al.* 2005), los erizos *Lytechinus pictus* (Díaz-Pérez, 2006) y especies del género *Strongylocentrotus* spp (Carpizo-Ituarte, Comunicación Personal; Santiago-Gonzalez, 2008). De esta manera, se sabe que la variación espacial y temporal en la estructura y composición de las comunidades bacterianas, puede contribuir significativamente a la variación del reclutamiento de los invertebrados marinos y por lo tanto a su dinámica poblacional (Hung *et al.* 2007).

1.2 Aspectos biológicos del erizo morado y erizo rojo

El erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) y erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) tienen una distribución geográfica desde Alaska hasta la isla de Cedros, Baja California (Kato y Schroeter, 1985). Ambos habitan en la zona del submareal con fondos rocosos entre 3 y 50 metros de profundidad (Palleiro, 2009), asociados a las comunidades de mantos de *Macrocystis pyrifera*. Ambas especies son consideradas claves para el ecosistema, ya que regulan la abundancia y distribución de los mantos de macroalgas (Steneck *et al.* 2002).

Son organismos dioicos, sin dimorfismo sexual y con fertilización externa; su ciclo de vida presenta dos fases de desarrollo, una fase larval plantónica y una fase bentónica; esta última determinada por los procesos de asentamiento y metamorfosis. Al nivel de macroescala (cientos de kilómetros), el asentamiento y la metamorfosis son muy variables y están en función de las condiciones oceanográficas de la zona, incluyendo los patrones de corrientes, eventos de surgencia, entre otros (Wing *et al.* 2003). Durante su ciclo de vida, los erizos presentan una alta mortalidad post-metamórfica debido a que son depredados por cangrejos, estrellas de mar y

peces (Cowen, 1983; Palleiro, 2009). Sin embargo, diversos estudios han mostrado que una de las estrategias para evitar altas mortalidades es mediante la asociación de las post-larvas con los erizos adultos en asociación (Rogers-Bennett *et al.* 1995; Hereu *et al.* 2004; Palleiro-Nayar *et al.* 2011), en donde es muy probable que las comunidades bacterianas jueguen un papel fundamental como las precursoras de las señales ambientales, para que las larvas de erizo de ambas especies se asienten y metamorfoseen en sitios con presencia de sus conspecíficos, para protección y disponibilidad de alimento (Díaz-Pérez, 2006; Nishizaki y Ackerman, 2006; Palleiro-Nayar *et al.* 2011).

Ambas especies de erizo tienen una importancia comercial, ya que las gónadas son utilizadas para el consumo humano. La explotación pesquera del erizo rojo *S. franciscanus* se viene realizando desde la década de los años sesenta, pero fue hasta 1972 que se inició a escala comercial (Palleiro-Nayar *et al.* 2008). La pesquería del erizo rojo *S. franciscanus* es la más importante en la región, debido al tamaño de las gónadas, así como de su buena calidad. Sin embargo, en 1993 se inició la captura del erizo morado *S. purpuratus* en Baja California como una alternativa pesquera debido al crecimiento desmesurado de su población y a la invasión del nicho ecológico del erizo rojo debido a la alta presión pesquera (Palleiro-Nayar *et al.* 2008).

1.3 Condiciones Oceanográficas en Baja California

La costa del Pacífico del Estado de Baja California está influenciada por el Sistema de la Corriente de California (SCC), la cual está compuesta por tres tipos de corrientes marinas (Lynn, 1987): 1) La corriente dominante conocida como la corriente de California (CC), la cual tiene un ancho de 1000Km, es superficial (0-300m) con dirección hacia el ecuador y se caracteriza por llevar aguas frías (10-15°C) provenientes del subártico, con baja salinidad (32-34‰) y ricas en oxígeno disuelto (Fig.1). 2) La Contracorriente de California, la cual tiene un ancho de 10 a 40m y es subsuperficial con dirección al Polo Norte; se caracteriza por llevar agua cálida proveniente del Pacífico Norte Central, con alta salinidad y bajo contenido de oxígeno disuelto y nutrientes. Además, su localización y profundidad puede variar dependiendo de la variabilidad de la fuerza del viento.

3) La corriente de Davison, que es una corriente débil con dirección al Polo Norte, la cual se cree que es parte de la Contracorriente de California (Lynn, 1987; Checkley Jr. y Barth, 2009). A lo largo de la Corriente de California ocurren eventos de surgencia, los cuales se caracterizan por transportar a la superficie agua fría, rica en nutrientes con alta salinidad (Bakun, 1996).

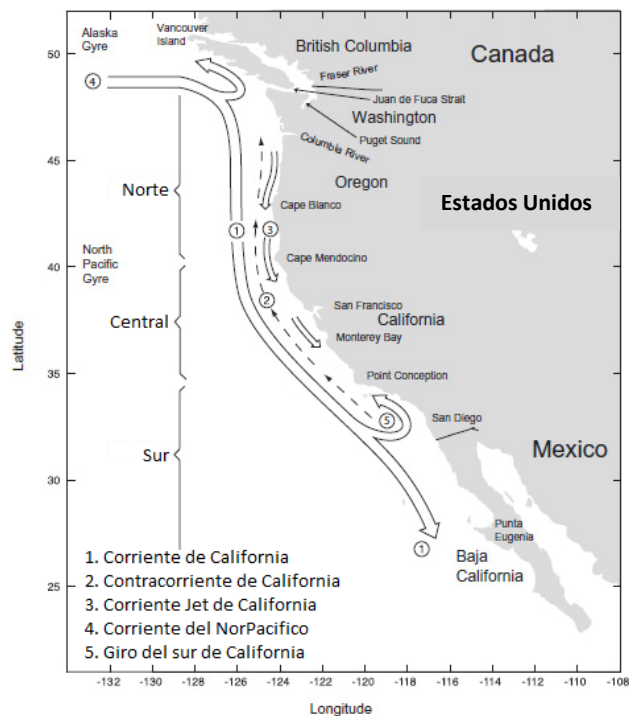


Figura 1. Mapa del Sistema de la Corriente de California. Principales regiones, corrientes y características geográficas (modificado de Checkley Jr. y Barth, 2009).

El sistema de la Corriente de California es una de las áreas más productivas del mundo, lo cual está muy relacionado con la alta actividad de eventos de surgencia en ciertas zonas específicas de la región (Zaytsev *et al.* 2003) (Fig. 2). En la figura 2, se observan tres sitios importantes de surgencia, los cuales son Punta Banda, Punta Baja y Punta Eugenia.

Los eventos de surgencia se presentan principalmente en la temporada de primavera y verano, generando una alta productividad en la región (Hernández de la Torre *et al.* 2004). Estos eventos son producidos por fuertes corrientes de viento y movimientos de masas de agua por el transporte de Ekman, lo que hace que aguas frías y profundas, ricas en nutrientes y oxígeno suban a la superficie cercana a la costa (Fig.3). Los eventos de surgencias tienen implicaciones importantes en el reclutamiento de muchos invertebrados marinos, ya que surgencias muy intensas alejaran las larvas fuera de la costa impidiendo que se asienten y recluten en las poblaciones de sus conespecíficos y por lo tanto una alteración en su dinámica poblacional (Rougharden *et al.* 1988).

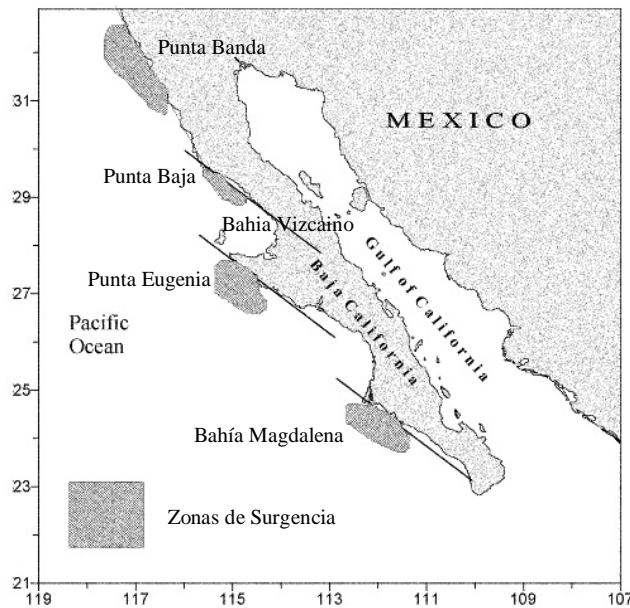


Figura. 2. Zonas de surgencias frecuentes a lo largo de la península de Baja California, México (modificado de Zaytsev *et al.* 2003).

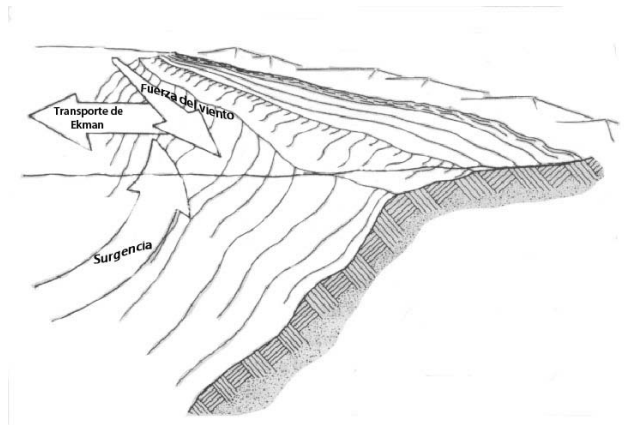


Figura 3. Diagrama de evento de surgencia. La costa se observa a la derecha de la figura. El transporte de agua hacia fuera de la costa por el transporte de Eckman, es debido a la fuerza del viento que va paralelo a la costa, la cual es remplazada por agua profunda que sube a la superficie. (Modificado de Bakun, 1996).

Temperaturas superficiales del océano demuestran que la parte norte del estado de Baja California presenta temperaturas bajas en comparación con la parte sur que comprende la Bahía de Vizcaino (Fig. 2), en donde se presentan giros oceánicos y se caracteriza por tener aguas más cálidas en ciertas estaciones del año (Peraza *et al.* 1993; Palacios-Hernandez *et al.* 1996). Por lo que la zona comprendida entre Punta Baja y Bahía Vizcaino es muy variable, lo que la hace una zona de gran importancia ecológica ya que representa el límite de distribución de muchas especies de ambientes templados, como el erizo de mar.

1.4 Anomalías térmicas y cambio climático

Actualmente se sabe que las variaciones térmicas en el océano provocadas por el ENSO (“El Niño Southern Oscillation”), la variación inter-decadal del Pacífico y el cambio climático global por efectos antropogénicos, generan eventos de estrés fisiológico en los organismos, los cuales afectan la supervivencia y distribución de una gran cantidad de organismos en el océano (Tomanek, 2010). Debido a que el erizo morado y el erizo rojo tienen una amplia distribución geográfica experimentan considerables gradientes de temperatura. Así mismo, están sujetos a variaciones interanuales de temperatura, especialmente como eventos de El Niño en la zona sur del estado de Baja California, en donde se han llegado a registrar temperaturas superficiales del océano por arriba de los 25°C, causando mortalidad a ambas especies de erizo (Tegner, 1996).

Durante eventos de El Niño, predomina agua cálida y salinidades altas en la región ecuatorial de la costa occidental del Pacífico, lo que ocasiona un incremento de temperatura en la capa superficial y en el nivel del mar. Esto a su vez, provoca el hundimiento de la termoclina y una disminución en los eventos de surgencia, lo que reduce el aporte de nutrientes a la zona eufótica (Fig.4) (Fedorov y Philander, 2000; Hernández de la Torre *et al.* 2004). En el evento de La Niña, se presentan condiciones de aguas frías, generando una termoclina somera lo que favorece al incremento de eventos de surgencia, acarreando aguas ricas en nutrientes a la superficie (Fig.4) (Latif y Keenlyside, 2008).

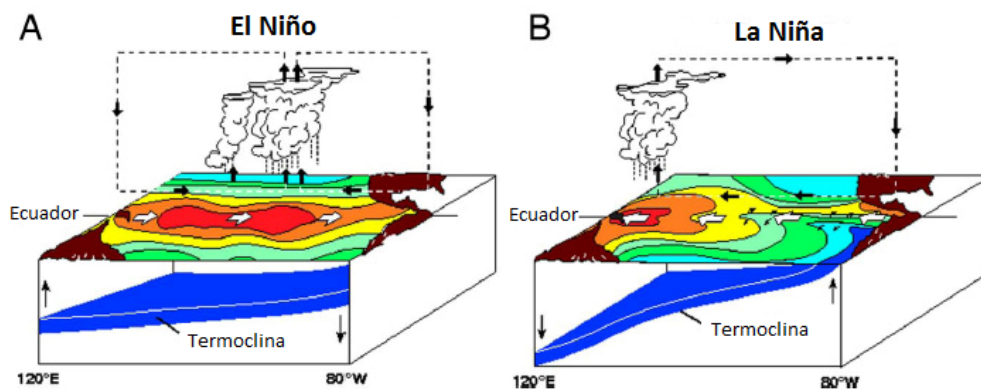


Figura 4. Eventos de El Niño (A), La Niña (B). (Modificado de Latif y Keenlyside, 2008)

Se considera que incrementos en la temperatura superficial promedio del océano por efecto del cambio climático, están ocasionando efectos directos en el desempeño fisiológico de los organismos en sus diferentes fases de su ciclo de vida (embrión, larva, adultos), así como en su supervivencia. Además, también tiene un efecto a nivel poblacional, alterando los patrones de dispersión y reclutamiento de los organismos (Harley *et al.* 2006). Para tener un mejor entendimiento de como el cambio climático global puede afectar su distribución y supervivencia, principalmente de aquellos organismos que tienen una amplia distribución y experimentan una gran variación de condiciones ambientales como son el erizo morado y el erizo rojo, es de vital importancia realizar estudios sobre la tolerancia de los organismos al estrés térmico.

1.5 Planteamiento del problema y estructura de la tesis

El erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* y el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* son muy importantes desde el punto de vista del ecosistema, ya que ambas especies mantienen estables las poblaciones que habitan en los mantos de macroalgas de *Macrocystis pyryfera*, la cuales están conformadas por langosta roja, abulones, caracoles, pepinos de mar y una gran variedad de especies de peces. Además representan una importante actividad pesquera para la región, ya que generan alrededor de 1,800 empleos y más de 3 millones de dólares por temporada de pesca (Salgado-Rogel y Palleiro-Nayar, 2008). Por lo que es fundamental conocer las variables ambientales y biológicas que controlan el asentamiento y la metamorfosis, las cuales influyen de manera directa en la dinámica poblacional de ambas especies.

En relación a lo anterior, es bien sabido que las comunidades bacterianas asociadas a superficies marinas, juegan un papel fundamental para inducir el asentamiento y metamorfosis en una gran variedad de invertebrados marinos, entre ellos el erizo morado y el erizo rojo. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende determinar la importancia en la inducción a la metamorfosis, de las comunidades bacterianas asociadas a las poblaciones de erizo morado (*S. purpuratus*), así como su variación espacial y temporal en dos localidades del intermareal a lo largo de la península de Baja California. Así mismo, se plantea determinar la capacidad en la respuesta fisiológica del erizo rojo y del erizo morado, ante condiciones de estrés térmico que pudieran experimentar en el océano y en condiciones extremas de temperatura. Lo anterior, mediante la determinación de sus límites de tolerancia térmica y su capacidad de iniciar el proceso de la metamorfosis.

La tesis se divide en tres capítulos: el capítulo 1 incluye una breve descripción sobre la importancia de las comunidades bacterianas durante el asentamiento y metamorfosis en larvas de invertebrados marinos, aspectos biológicos del erizo rojo *S. franciscanus* y erizo morado *S. purpuratus*, así como las condiciones oceanográficas de la región a las que están expuestas ambas especies de erizo y las comunidades bacterianas; el capítulo 2 comprende el análisis de la variación espacial y temporal de las comunidades bacterianas heterótrofas cultivables en la localidad de Punta Baja, la cual que es una zona de importancia pesquera de erizo morado, y la localidad de Playa Esmeralda, en donde no hay presencia de erizo morado y es una región que

experimenta condiciones oceanográficas contrastantes. Lo anterior resulta útil para comparar las comunidades bacterianas aisladas en ausencia de erizo morado, para de esta manera, determinar si las comunidades bacterianas importantes para la generación de claves ambientales que estimulan la metamorfosis de las larvas de erizo morado, presentan una estabilidad espacial y temporal y están presentes solamente donde se encuentran poblaciones de la especie de erizo morado. El capítulo 3 comprende el estudio de la capacidad fisiológica de las larvas de ambas especies de erizo para tolerar incrementos en temperatura, así como la determinación del efecto del estrés térmico en la supervivencia y retraso de la metamorfosis. De esta manera, con la información obtenida se pretende determinar los límites de tolerancia térmica de ambas especies ante los incrementos de temperatura en el océano por efectos de variaciones térmicas como el ENSO y predicciones de cambio climático en la península de Baja California. En general con el presente trabajo se pretende determinar la importancia de las comunidades bacterianas como inductoras a la metamorfosis, así como su variación espacial y temporal, la cual pudiera estar relacionada con el reclutamiento del erizo, mediante el asentamiento y la metamorfosis. Así mismo se pretende determinar los límites de tolerancia térmica larval así como el efecto del estrés térmico durante el inicio de la metamorfosis, el cual pudiera tener efectos adversos en la supervivencia y distribución del erizo de mar a consecuencia de incrementos de temperatura por efectos del cambio climático y calentamiento global.

Objetivo General:

- Determinar la variación espacio-temporal de las comunidades bacterianas heterótrofas cultivables asociadas a las poblaciones de erizo morado, y su posible papel en la inducción de la metamorfosis de las larvas de *Strongylocentrotus purpuratus*, así como determinar los efectos del estrés térmico en la supervivencia y retraso de la metamorfosis en *S. purpuratus* y *Strongylocentrotus franciscanus*.

Objetivos particulares:

- Realizar un análisis de la variación espacio-temporal de los géneros bacterianos asociados a diferentes sustratos en el intermareal en la localidad de Punta Baja y Playa Esmeralda en Baja California, México.
- Realizar un análisis de la variación espacio-temporal de los perfiles metabólicos de las bacterias encontradas en ambas localidades de muestreo.
- Determinar la importancia en la inducción a la metamorfosis en larvas de erizo morado de películas bacterianas monoespecíficas de las cepas aisladas de los sitios de muestreo.
- Determinar los límites de tolerancia térmica en estadios avanzados de desarrollo en los erizos morado (*S. purpuratus*) y rojo (*S. franciscanus*).
- Determinar el efecto del estrés térmico en la supervivencia y retraso de la metamorfosis en ambas especies de erizo.

Capítulo 2. Variación espacio-temporal de las comunidades bacterianas asociadas a las poblaciones de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* en el intermareal rocoso y su efecto en la inducción a la metamorfosis.

2.1 Introducción

Las bacterias son de vital importancia en el océano, ya que participan en los ciclos biogeoquímicos de la mayoría de los principales elementos (carbono, nitrógeno, entre otros) (Karl, 2002), aportando nutrientes a los niveles altos de la cadena trófica, así mismo, son de gran importancia en diferentes áreas de la industria y medioambiente (farmacéutica, biotecnología, biorremediación) y han contribuido en los últimos años para la obtención de diversos compuestos bioactivos (Lazarini *et al.* 2000). Además como ya se ha mencionado, favorecen el asentamiento y metamorfosis de una gran diversidad de invertebrados marinos, mediante la generación de señales ambientales (Huang y Hadfield, 2003; Dobretsov y Qian, 2006; Hung *et al.* 2007; Dworjanyn y Pirozzi, 2008). Por lo tanto, es de vital importancia el conocimiento de la diversidad y distribución bacteriana en el planeta, así como el papel que juega de cada una de las especies en el ecosistema (Fry J, 2000).

Estudios realizados en los últimos 20 años sobre la diversidad bacteriana en ambientes marinos, han demostrado que los principales grupos bacterianos encontrados en el océano pertenecen al filo de las γ -*proteobacterias*, α -*proteobacterias* y *Bacteroidetes* (González y Moran, 1997; Stabili y Cavallo, 2004). Así mismo, mediante el uso de la metagenómica, la cual permite el acceso a la información genética de organismos no cultivables, se ha llegado a tener un conocimiento más preciso sobre los grupos bacterianos presentes en el océano. Lo anterior ha generado que en los últimos años se incremente el número de divisiones bacterianas a más de 100, sin embargo solamente 30 grupos tienen representantes cultivables (Achtman y Wagner, 2008). Es bien sabido que en la mayoría de los ambientes, el 99% de las bacterias no son cultivables (Riesenfeld *et al.* 2004), sin embargo a pesar de los avances en el área de la biología molecular y la metagenómica, es esencial el establecimiento de cultivos bacterianos. La obtención de los cultivos bacterianos, brinda la posibilidad de conocer la fisiología de los

organismos de una manera más amplia (Streit y Schmitz, 2004). De esta manera, mediante cultivos bacterianos se puede establecer qué sustratos son utilizados en ciertas condiciones ambientales, el tipo de metabolitos secundarios que pueden estar generando, además son de gran utilidad para una caracterización taxonómica completa. Por lo tanto, los cultivos son un requisito para la ecología microbiana si se quiere llegar a conocer su funcionamiento en el planeta (Joint, *et al.* 2010).

La importancia del estudio de las comunidades bacterianas para el área de la ecología larval en el océano, ha ido en aumento en los últimos años, ya que ha ayudado a entender el papel que juegan las bacterias en la dinámica poblacional de muchas especies de invertebrados marinos, mediante la generación de señales ambientales que inducen el asentamiento y metamorfosis larval, en ambientes óptimos para su supervivencia y desarrollo (Hadfield, 2011). Actualmente se sabe que estas bacterias forman grandes asociaciones bacterianas denominadas “biopelículas”, las cuales se pueden generar en cualquier superficie (natural o artificial) en el océano. Estas biopelículas están constituidas por una gran diversidad de grupos bacterianos (Huang y Hadfield, 2003), sin embargo se ha visto que esta diversidad depende de las condiciones ambientales y del sustrato en donde se encuentren (Costerton y Wilson, 2004).

Diversos estudios han demostrado que biopelículas asociadas a diferentes superficies (sedimento, rocas, invertebrados marinos, macroalgas y algas coralinas) presentan una diversidad bacteriana característica (Lau *et al.* 2005; Huggett *et al.* 2006), las cuales generan señales ambientales específicas que pueden ser reconocidas de manera diferencial por distintas formas larvales de los diversos grupos de invertebrados marinos. Lo anterior fue observado para *Balanus amphitrite*, en donde las larvas pudieron discriminar entre biopelículas generadas en diferentes condiciones y solamente se asentaron y metamorfosearon en aquellas biopelículas asociadas a sus conoespecíficos (Khandeparker *et al.* 2006). Lo mismo fue observado para el erizo blanco *Lytechinus pictus*, en donde además se observó que la composición de géneros bacterianos encontrados, era diferente al de las biopelículas generadas en presencia de otros invertebrados marinos (Díaz-Pérez, 2006).

De esta manera, entender el papel de las comunidades bacterianas (fracción cultivable) asociadas a las poblaciones de *S. purpuratus*, involucradas en la generación de señales ambientales para estimular la metamorfosis, es fundamental para comprender la distribución de las poblaciones del erizo en la región. Por lo que el objetivo de esta parte de la investigación, fue realizar una caracterización a microescala de los grupos bacterianos heterótrofos cultivables presentes en las biopelículas asociadas al hábitat intermareal del erizo morado (*S. purpuratus*), determinar su variación espacial y temporal, así como la capacidad de las bacterias aisladas para inducir a las larvas a la metamorfosis.

2.2 Metodología

2.2.1 Sitios de muestreo y recolección de muestras:

Las bacterias heterótrofas cultivables fueron muestreadas del intermareal rocoso en las localidades de Punta Baja (29° 56' 58.29" N, 115° 48' 42.65" W) y Playa Esmeralda (28° 30' 55.35" N, 114° 04' 15.38" W) en Ensenada Baja California, México (Fig. 5). Los muestreos fueron realizados durante los años 2007, 2008, 2009 y 2010 en las temporadas y localidades que se presentan en la Tabla 1.

Año	Mes	Temporada	Localidad
2007	Marzo	Invierno – Primavera	Punta Baja
2007	Diciembre	Invierno	Punta Baja
2008	Noviembre	Otoño	Punta Baja – P. Esmeralda
2009	Abril	Primavera	Punta Baja – P. Esmeralda
2010	Marzo	Invierno – Primavera	Punta Baja – P. Esmeralda

Tabla 1.- Fechas y localidades de recolecta de muestras bacterianas.

Para la toma de muestras en la localidad de Punta Baja, se trabajó en una zona utilizada por el grupo de PIACCEC (Programa Interdisciplinario para el Aprovechamiento, Conocimiento y Conservación de los Ecosistemas Costeros) del Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

El sitio es una plataforma del intermareal rocoso de alrededor de 100m de longitud que queda descubierta durante las mareas bajas. Para fines prácticos de esta investigación se utilizó como referencia la plataforma utilizada por PIACCEC, en la cual se habían establecido 5 transectos de muestreo perpendiculares a la costa.

Para el presente estudio, la plataforma del intermareal se delimitó virtualmente en tres zonas, la zona alta la cual se determinó como el sitio hasta donde fue posible observar la presencia de erizo morado, la zona baja la cual está adjunta al océano y la zona media o zona de pozas intermareales (Fig. 6).



Figura 5.- Localización de los sitios de muestreo en el municipio de Ensenada Baja California, México.

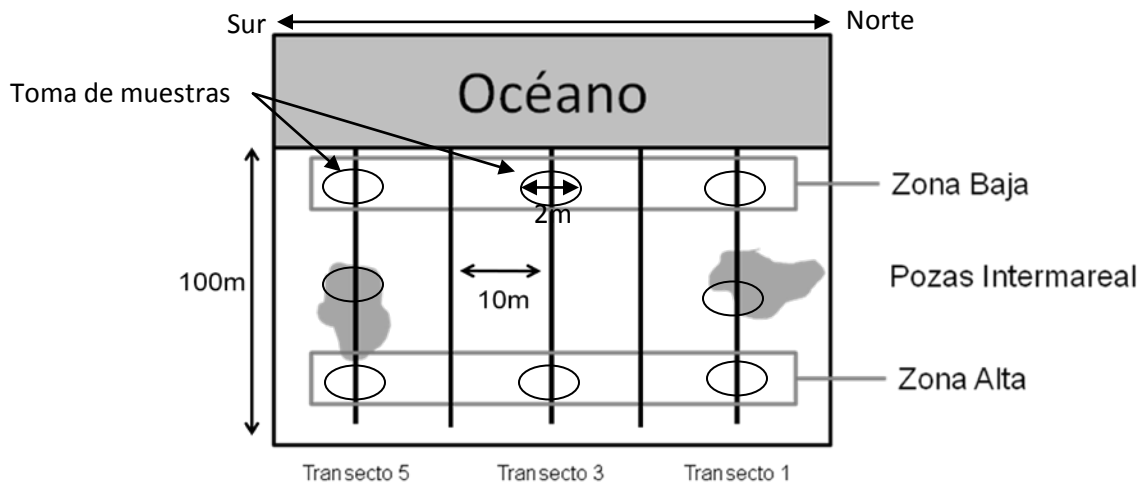


Figura 6.- Esquematzación del sitio de muestreo en Punta Baja, Baja California en condición de marea baja.

Para esta investigación se utilizaron como referencia solo los transectos 1, 3 y 5. Todas las muestras se tomaron en condición de marea baja y al azar en un radio de 2m de cada transecto en las tres zonas del intermareal delimitadas virtualmente, a excepción del transecto 3 en el que no había poza intermareal (Fig. 6). Las muestras tomadas en cada transecto para la localidad de Punta Baja, fueron principalmente de tres tipos de sustrato: erizo morado (*S. purpuratus*), la alga roja *Corallina vancouverensis* (la cual era muy común) y muestras de agua de mar. En algunos casos se recolectaron muestras de otros sustratos dependiendo de la temporada y su presencia en las zonas de muestreo, como fue el caso de conchas de choros (*Mytilus californianus*) y otras especies de algas rojas como *Plocamium* sp, *Lithothamnium californicum* (coralina incrustante), *Bossiella orbigniana* y *Laurencia pacifica*.

En la localidad de Playa Esmeralda solo fue posible recolectar muestras en una poza intermareal en la zona baja, ya que fue solamente en esta poza donde se encontraron algunos ejemplares de erizo negro (*Arbacia incisa*), cabe mencionar que en esta localidad no hay presencia de erizo morado. Las muestras en este sitio fueron tomadas a partir de sustratos como: erizo negro, agua de mar y *Corallina vancouverensis*. Dependiendo de la temporada y su presencia en la zona de muestreo también se recolectaron muestras de *Chondracanthus canaliculatus* (alga roja).

2.2.2 Toma de muestras bacterianas de los sustratos

La toma de muestras bacterianas a partir de erizos morados, erizos negros y conchas de choros se realizaron mediante el raspado de los organismos con hisopos estériles, los cuales fueron posteriormente almacenados en tubos de ensayo con 2mL de agua de mar esterilizada previamente. Para la toma de muestras de agua, se tomaron 2mL de agua de mar de los sitios de muestreo en tubos de ensayo de 5mL previamente esterilizados. En el caso de la toma de muestras de las especies de algas, se tomó un pequeño fragmento de cada especie y fueron colocadas en 3 mL de agua de mar previamente esterilizada. Todas las muestras fueron colocadas en hieleras y transportadas al Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas en Ensenada, Baja California para su aislamiento e identificación.

2.2.3 Aislamiento y purificación de bacterias

Los tubos de ensayo que contenían los hisopos con las muestras bacterianas obtenidas de los diferentes sustratos, fueron sometidas en agitación por vortex durante 1 minuto para facilitar el desprendimiento de las células de bacterias del algodón y, mediante el uso de pinzas de disección estériles se retiró el hisopo del tubo. Para las muestras que contenían las algas marinas, éstas fueron retiradas de los tubos de ensayo con pinzas de disección estériles y colocadas en pequeñas cajas Petri (35x10mm) estériles. Con hisopos estériles se raspó por completo el alga y el hisopo se colocó en agua de mar previamente esterilizada, el cual fue sometido en agitación por vortex durante 1 minuto. Al terminar la agitación, el hisopo fue retirado con unas pinzas estériles. Para las muestras de agua de mar, estas fueron filtradas a 100 μm para retirar todo el material particulado y posteriormente fueron centrifugadas a 12,000 g (gravedad) durante 2 minutos para precipitar las células bacterianas; a continuación se retiró el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 500 μl de agua de mar previamente esterilizada. Todos estos procedimientos se realizaron en condiciones estériles tras mechero.

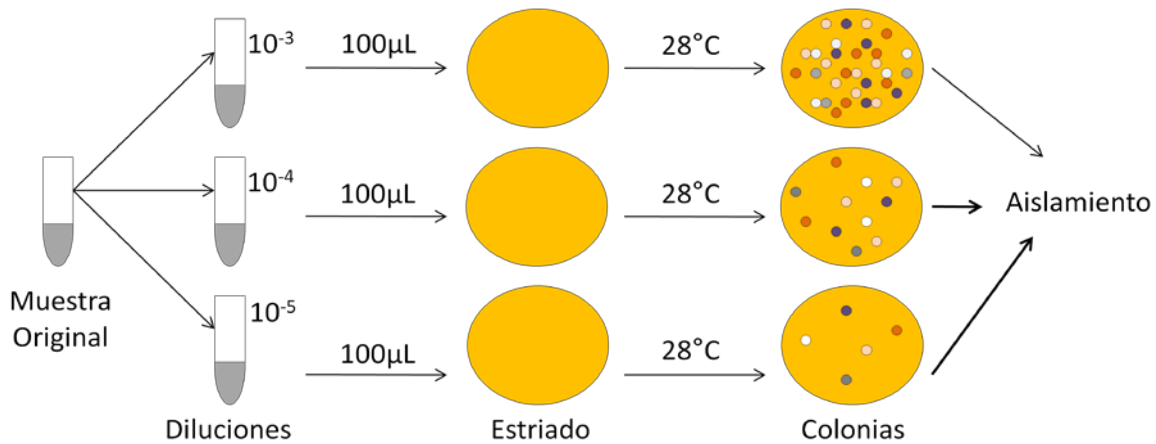


Figura 7.- Metodología desarrollada para el aislamiento de bacterias recolectadas en el campo.

Para el aislamiento de las cepas bacterianas, se realizaron diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} con agua de mar previamente esterilizada para todas las muestras aisladas; posteriormente se tomaron 100 µl de cada dilución y este fue adicionado a cajas Petri con medio marino sólido (Agar Marino Difco 2216) (Fig. 7). A continuación se realizó un estriado por toda la caja mediante el uso de rastrillos de plástico previamente esterilizados, con la finalidad de favorecer la separación de las células y por lo tanto, facilitar su aislamiento y purificación. Las cajas fueron incubadas a 28°C durante 1 semana, posteriormente se aislaron alrededor de 10 a 15 cepas bacterianas de las tres diluciones (Fig. 7). Para seleccionar las cepas bacterianas se consideraron varios aspectos como la morfología, coloración, elevación y margen de la colonia (Fig. 8).

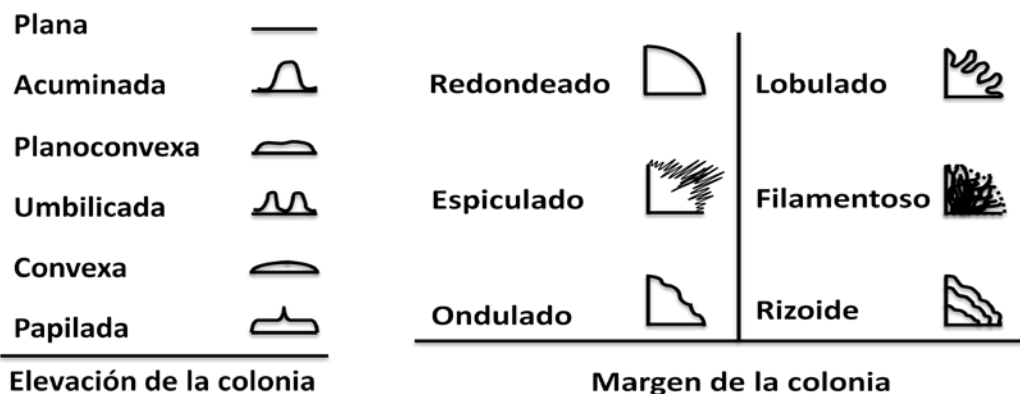


Figura 8.- Características morfológicas de las colonias bacterianas consideradas para su aislamiento y purificación (modificado de Gephardt *et al.* 1981).

Una vez que las colonias fueron seleccionadas con base en sus características morfológicas, éstas se aislaron mediante el uso de palillos de dientes estériles por picadura de colonia, o bien mediante el uso de un asa de inoculación estéril y fueron puestas en 2ml de caldo marino nutritivo (Difco 2216) (ver anexo). Posteriormente los cultivos se colocaron en agitación (200rpm) a una temperatura de 28°C durante 24 horas para favorecer su crecimiento; una vez que los cultivos crecieron, éstos fueron estriados en medio agar marino y colocados a 28°C durante 48 horas (Fig. 9). Después de las 48 horas se comprobó el grado de purificación de las cepas bacterianas; si por alguna razón se encontraba contaminación se realizaba otro aislamiento de la cepa a partir de la caja Petri original hasta obtener la cepa completamente pura.

A cada una de las cepas le fue asignado un código de identificación en el que fue posible identificar el origen y las características de cada muestra. Por ejemplo en el código 3PBB1z0409, el número 3 representa el número de transecto de donde se tomó la muestra; las siguientes dos letras (PB) representan la abreviación del sitio de muestreo, que en este ejemplo corresponden a Punta Baja; la segunda letra B, representa la zona del intermareal donde fue tomada la muestra, en este caso corresponde a la zona baja, la zona alta se representó con la letra “A” y las pozas de intermareal con la letra “P”; a continuación el número 1 representa el sustrato de donde se obtuvo la muestra, en este caso sería de *S. purpuratus*, la letra “z” significa el medio de cultivo utilizado para cultivar la cepa, el cual fue medio Zobell; y por último, los 4 números finales representan el mes y el año de muestreo que para este ejemplo corresponden a Abril del 2009.

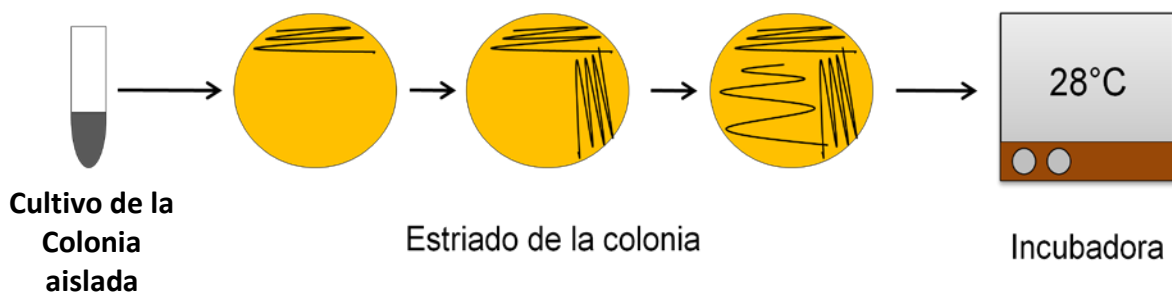


Figura 9.- Procedimiento realizado para la purificación de colonias mediante estriado en placa.

2.2.4 Identificación bioquímica y molecular de las cepas bacterianas

2.2.4.1 Identificación bioquímica:

Las cepas bacterianas aisladas fueron identificadas mediante el uso de pruebas bioquímicas convencionales (Tabla 2), así como por su morfología y sus características de su pared celular de acuerdo con la tinción de Gram (ver protocolos en anexo I).

Pruebas bioquímicas realizadas	
Oxidasa	Catalasa
Movilidad	Oxidación – Fermentación
Salinidad 0%	Sensibilidad al antibiótico 0/129 (concentraciones de 10 y 150µg/mL)
Salinidad 6%	Crecimiento en TCBS (medio selectivo para vibrios y fermentadores de sacarosa)
Salinidad 8%	Crecimiento medio McConkey (medio selectivo para bacterias entéricas y fermentadoras de lactosa)

Tabla 2.- Pruebas bioquímicas básicas utilizadas para la identificación de las cepas bacterianas aisladas de los sitios de muestreo.

La identificación de los géneros bacterianos se realizó mediante el uso del manual Bergey's (Holt *et al.* 2004), así como de esquemas taxonómicos (Oliver 1982; Muroga *et al.* 1987; Alsina y Blanch 1994a; Alsina y Blanch 1994b) y literatura de referencia para la identificación de bacterias marinas (Ventosa *et al.* 1998; Vera *et al.* 1998; Nakamura *et al.* 1999; Labrenz *et al.* 2000; Hedlund y Staley, 2001; Ivanova *et al.* 2001; Abbott *et al.* 2003; Gómez-León *et al.* 2005; Jung *et al.* 2007; Nam *et al.* 2007; Khudary *et al.* 2008; Lijima *et al.* 2009; Martins *et al.* 2010; Raj *et al.* 2010).

2.2.4.2 Criopreservación de cepas bacterianas

Todas las cepas bacterianas aisladas y purificadas durante esta investigación fueron criopreservadas en un ultracongelador a -80°C con glicerol al 40% (ver protocolo en anexo I), creando así el primer cepario de bacterias marinas para el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO). Todas las cepas criopreservadas se guardaron por duplicado, además cada año las cepas bacterianas eran renovadas y criopreservadas de nuevo con el fin de prolongar su viabilidad para experimentos posteriores.

2.2.4.3 Identificación Molecular:

Un grupo de 68 bacterias aisladas de erizo morado y *C. vancouverensis* en diferentes temporadas de la localidad de Punta Baja, fueron seleccionadas de acuerdo a sus características morfológicas (ver figura 8) para ser identificadas con métodos moleculares mediante la amplificación del gen ribosomal 16S.

2.2.4.3.1 Extracción de DNA genómico.

Las bacterias fueron cultivadas en 2mL de caldo marino (ver anexo I) en agitación constante (200rpm) durante 12 horas a 28°C. La extracción del DNA genómico se realizó mediante el uso del kit "GenElute Bacterial Genomic DNA (NA2120) de Sigma – Aldrich (ver protocolo en anexo II). Se determinó la calidad del DNA genómico mediante su visualización por electroforesis en geles de agarosa al 1% (ver protocolo en anexo II) con SYBR Green (Invitrogen S7563).

2.2.4.3.2 Amplificación del gen ribosomal 16S.

Mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó el gen ribosomal 16S. Se utilizaron dos pares de cebadores (primers); un par fue el 8F (5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3') y el 1492R (5'-GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T-3') (Huang y Hadfield, 2003), los cuales amplifican un fragmento de alrededor de 1,300–1400pb aproximadamente.

El segundo par utilizado fue el 27F (5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-A-'3) y el 785R (5'-CTA-CCA-GGG-TAT-CTA-ATC-C-3') (Lau *et al.* 2002), los cuales amplifican un fragmento de 750pb aproximadamente. Ambos pares de cebadores son específicos para el dominio *Bacteria*.

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25µL (ver anexo II) y las condiciones para las reacciones de PCR fueron la siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, con una extensión de último paso de 10 min a 72°C. Para la purificación de los fragmentos de PCR se realizó la extracción de bandas del gel de agarosa mediante el uso del kit “PureLink Quick Gel Extraction kit” (K2100-12) de Invitrogen (ver protocolo en anexo II).

2.2.4.3.3 *Secuenciación de productos de PCR.*

Los fragmentos de PCR purificados fueron secuenciados de acuerdo a las especificaciones de SeqXcel DNA sequencing service (<http://www.seqxcel.com>). En un volumen de 12µl se concentraron de 20 a 30ng de productos de PCR por cada 100pb del fragmento. Las muestras fueron procesadas con un kit para secuenciación (BigDye® Terminador cycle sequencing kit) y purificadas de acuerdo a los protocolos de “Biosystems DNA sequencing”. Para secuenciar se utilizó el primer 8F para 54 cepas bacterianas y el primer 785R para 14 cepas bacterianas.

2.2.4.3.4 *Análisis de secuencias y construcción de árboles filogenéticos.*

Las secuencias fueron verificadas mediante la observación de los cromatogramas para determinar la calidad de la secuencia de cada cepa bacteriana mediante el uso del software ChromasPro versión 1.5 y el software BioEdit versión 7.0.5.3. Una vez analizadas y editadas las secuencias, se realizó un alineamiento en bases de datos de secuencias nucleotídicas en el sitio web del GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y el sitio web de RDP (Ribosomal Database Project) (www.rdp.cme.msu.edu), para comparar las secuencias y determinar el género y/o especie bacteriana a la que pertenecían. El análisis filogenético se realizó mediante el uso del software MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis), y el árbol filogenético se construyó utilizando el método de neighbor-joining

(vecino más cercano) (Saitou y Nei, 1987), calculando la distancia nucleotídica (p-distance) y el análisis bootstrap fue basado en 1,000 repeticiones (Tamura, 2007). Para el análisis filogenético se utilizaron fragmentos de secuencias de 100 a 200pb, de 200 a 300pb, de 300 a 400pb y de 450 a 550pb para las cepas que se amplificaron con el primer 8F. Para las cepas que se amplificaron con el primer 785R se utilizaron fragmentos de secuencias entre 200 y 350pb, 500-600pb y 700-750pb.

2.2.5 Análisis espacio-temporal de la diversidad metabólica bacteriana de Punta Baja y Playa Esmeralda

El análisis de la diversidad metabólica se realizó mediante la creación de una matriz de datos binarios de las pruebas bioquímicas realizadas a todas las bacterias para cada localidad de muestreo. Se realizó un análisis por el coeficiente de emparejamiento simple de los datos para determinar el porcentaje de similitud existente entre los sustratos (de donde se aislaron las bacterias) y su posible relación espacial (entre los transectos) y temporal, así como la construcción de agrupamientos (Clusters) y análisis de escalamiento multidimensional (MDS) en dos dimensiones para todos los sitios de muestro. El análisis se realizó mediante el software Primer 6 versión 6.1.10.

2.2.6 Análisis de diversidad espacio-temporal de géneros bacterianos de Punta Baja y Playa Esmeralda

El análisis de diversidad de géneros bacterianos para ambas localidades de muestreo en diferentes temporadas, se realizó mediante la creación de una matriz de datos binarios considerando la presencia o ausencia de los géneros bacterianos en las localidades. Se realizó una matriz de similitud basada en el análisis estadístico del coeficiente de Jaccard para determinar el porcentaje de similitud espacio-temporal entre las localidades, así como la construcción de agrupamientos (Clusters) y análisis MDS en dos dimensiones para todos los sitios de muestreo. El análisis de diversidad bacteriana se realizó mediante el uso del software Primer 6 versión 6.1.10.

2.2.7 Ensayos de inducción a la metamorfosis con bacterias aisladas del campo

2.2.7.1 Cultivo de larvas de erizo morado y generación de películas bacterianas mono-específicas

La producción y mantenimiento de larvas de erizo morado se realizó de acuerdo al método descrito por Carpizo-Ituarte *et al.* (2002). Los óvulos fertilizados se mantuvieron en cubetas de 20 litros con agua de mar filtrada a 1 y 5µm y pasada a través de luz ultravioleta, a la cual llamaremos de ahora en adelante como “AMF”, donde alcanzaron el estadio larvario de prisma. Posteriormente las larvas fueron transferidas a tanques cónicos de 45 litros a una densidad de 3 larvas/ml con aireación continua, y fueron alimentadas diariamente con la microalga *Rhodomonas* sp (concentración de 17,000 células/ml) hasta que las larvas alcanzaron el estadio de competencia. El estadio competente se alcanzó a los 23 días, a una temperatura de cultivo entre 15 – 17 °C. Se consideraron larvas competentes cuando el rudimento era claramente visible ocupando la región derecha del cuerpo larval y, por la presencia de pies ambulacrales bien diferenciados de acuerdo a lo descrito por Carpizo-Ituarte *et al.* (2002).

Para la generación de películas bacterianas mono-específicas, las cepas aisladas fueron cultivadas en 10ml de medio líquido hasta que alcanzaron una densidad mayor a 10⁷ células/ml. Posteriormente en cajas de plástico de seis pozos (Falcon) se adicionó un volumen determinado de bacterias (dependiendo de la concentración bacteriana de cada cepa el inóculo inicial osciló entre 100 y 800 µl) en cada pozo con medio líquido en un volumen final de 5ml, con la finalidad de que todas las cepas bacterianas tuvieran la misma densidad de 10⁷ células/ml al momento de iniciar la formación de la película mono-específica. Se utilizó la siguiente ecuación para determinar el volumen de cultivo bacteriano necesario para iniciar la formación de la película bacteriana con una concentración de 10⁷ células/ml (Ec.1)

Ecuación 1:

$$\text{Volumen a adicionar} = \frac{\text{Concentración deseada}}{\text{Concentración del medio de cultivo}} * 5 \text{ mL}$$

Las cajas de 6 pozos fueron mantenidas a 28°C durante 48 horas para la formación de la biopelícula en los pozos; posteriormente el medio de cultivo se retiró y se enjuagó la biopelícula una ó dos veces con agua de mar filtrada y esterilizada para eliminar el exceso de bacterias. Por último se adicionaron 5ml de agua de mar esterilizada para realizar los experimentos.

2.2.7.2 Ensayos de inducción a metamorfosis con películas bacterianas monoespecíficas

Se adicionaron entre 20 y 30 larvas competentes en los pozos con las biopelículas previamente formadas. Se realizaron tres réplicas por tratamiento. En todos los experimentos se incluyeron un control positivo que consistió en la inducción a metamorfosis con KCl (100mM) durante 15 minutos, y un control negativo en donde las larvas permanecieron en AMF previamente esterilizada durante todo el periodo experimental de acuerdo a lo descrito por Carpizo-Ituarte et al (2002). El porcentaje de metamorfosis se evaluó a las 12 y 24 horas de iniciado el experimento.

2.2.7.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el uso del software SigmaStat 3.5 (SigmaPlot 11). A los datos en porcentaje se les realizó la transformación arcoseno previo a los análisis estadísticos. Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar normalidad y se determinó la homogeneidad de varianzas. Los datos que no fueron normales y/o no presentaron homogeneidad de varianzas se les aplicaron pruebas no paramétricas. Los análisis estadísticos se realizaron mediante un análisis de varianza de 1-vía (ANOVA). Se utilizó la prueba de Fisher LSD (Least Significant Difference) como prueba *a posteriori* para establecer diferencias entre los tratamientos. Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0.05$ con un nivel de confianza del 95%.

2.3 Resultados

2.3.1 Aislamiento, purificación e identificación bacteriana

2.3.1.1 Aislamiento y Purificación

De cada sustrato se aislaron y purificaron entre 8 y 12 cepas bacterianas entre marzo del 2007 y marzo del 2010. En total se aislaron y purificaron alrededor de 483 cepas, de las cuales, 393 se aislaron de la localidad de Punta Baja, mientras que para la localidad de Esmeralda se aislaron 90 cepas. Las cepas bacterianas fueron seleccionadas de acuerdo a las características morfológicas de cada colonia (Fig. 8). Alrededor del 60% de las colonias tuvieron una coloración blanco-grisáceo, un 30% translúcidas y un 10% entre naranja y amarillo. Más del 70% de las cepas presentaron formas de colonia planoconvexas, mientras que el 30% restante estuvo compuesto por cepas con formas planas y convexas. El 80% de las cepas presentaron un margen de colonia redondeado, el 20% correspondió a cepas con márgenes de colonia ondulado, lobulado y rizoide (Fig. 10).

2.3.1.2 Identificación bacteriana

2.3.1.2.1 Pruebas bioquímicas:

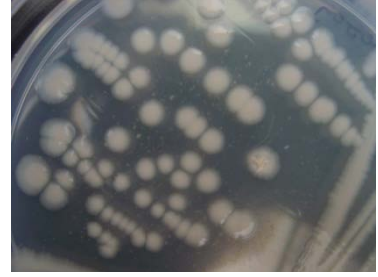
Un total de 11 pruebas bioquímicas fueron realizadas para identificar los géneros bacterianos presentes en ambas localidades de muestreo, así como para determinar el tipo de metabolismo de cada una de las cepas aisladas. Se identificaron un total de 428 cepas, de las cuales 338 correspondieron a la localidad de Punta Baja y 90 a la localidad de Playa Esmeralda.



Enterobacteriaceae



Pseudoalteromonas sp.



Enterococcus sp.



Vibrio sp.



Flavobacterium sp.



Aeromonas sp.



Pseudoalteromonas sp.



Vibrio sp.



Halomonas sp.



Photobacterium sp.



Pseudomonas sp.



Vibrio sp.

Figura 10. Características morfológicas de las bacterias aisladas de las localidades de Punta Baja y Playa Esmeralda, Baja California, México.

2.3.2 Cepas aisladas de Punta Baja

De las 338 cepas bacterianas heterótrofas cultivables aisladas para esta localidad, el 94.7% fueron bacterias que pertenecieron al grupo de las Gram negativas, mientras que el 5.3% restante pertenecieron al grupo de las Gram positivas (Fig. 11). La mayoría de las cepas fueron catalasa y oxidasa positivas (97.7 y 92.7%, respectivamente); así mismo el 84.7% fueron bacterias que presentaron motilidad. En cuanto al metabolismo de la glucosa, el 75.5% fueron capaces de oxidarla, y el 95.2% tuvieron la capacidad de fermentarla. Esto significa que la mayoría de las bacterias aisladas presentaron un metabolismo anaerobio facultativo (Fig. 11). El 90.5% de las bacterias no pudo crecer sin presencia de sal en el agua (0% salinidad), sin embargo se observó crecimiento del 66.5% para condiciones de salinidad al 6% (60 gr/l) y de 34.6% en condiciones hipersalinas de 8% de salinidad (80 gr/l).

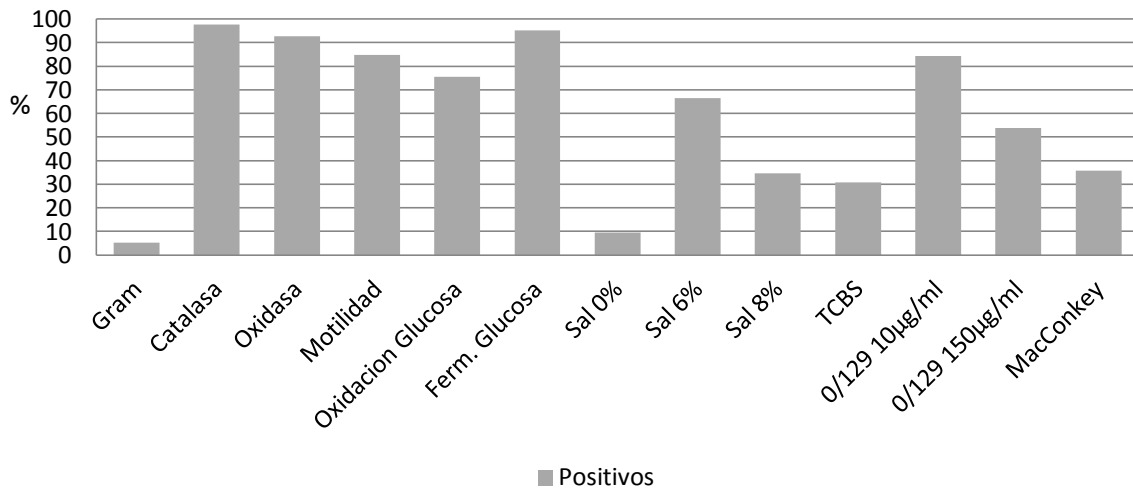


Figura 11. Porcentaje del total de las cepas bacterianas que presentaron crecimiento positivo para las distintas pruebas bioquímicas realizadas.

En cuanto al crecimiento en medios selectivos, se observó que alrededor del 30% de las cepas crecieron en medio TCBS (medio selectivo para el género *Vibrio*), de las cuales el 75% presentaron una coloración de colonia amarilla, lo que significa que son bacterias que tienen la capacidad de fermentar la sacarosa, mientras que el 25% presentó una coloración verde (no fermentadoras de sacarosa) (Fig. 12a). El 84.3% de las cepas crecieron en medio con el agente

0/129 a una concentración de 10 µg/ml, el cual es un medio sensible al género *Vibrio*; así mismo, el 53.9% de las cepas mostró crecimiento a una concentración de 150 µg/ml (Fig 11). Por último, para el medio selectivo MacConkey, el cual es específico para el crecimiento de bacterias Gram negativas y fermentadoras de lactosa, se observó un porcentaje de crecimiento del 35%, de las cuales el 51% fueron colonias de color blanco (no fermentadoras de lactosa), el 36% colonias de color rosa (fermentadoras de lactosa) y el 13% no se evaluó el color de la colonia (Fig.12b).

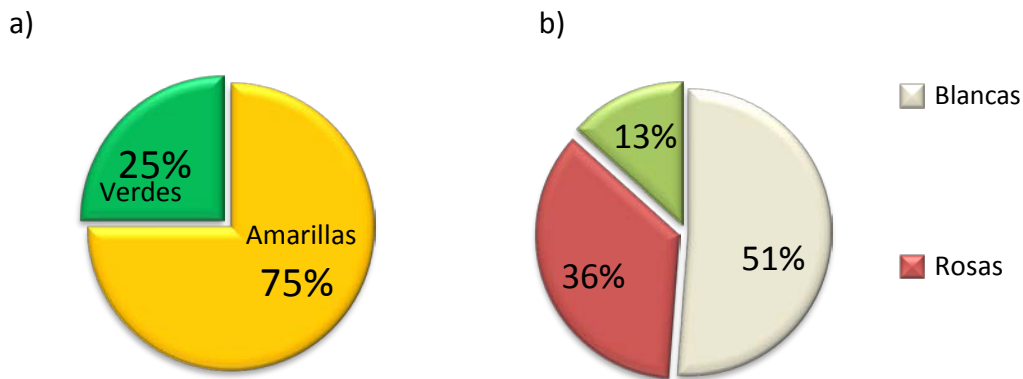


Figura 12. a) Porcentaje de cepas que crecieron en medio selectivo TCBS fermentadoras de sacarosa (amarillas) y no fermentadoras de sacarosa (verdes); b) Porcentaje de cepas que crecieron en medio selectivo MacConkey, fermentadoras de lactosa (color rosa) , no fermentadoras de lactosa (blancas) y cepas que no se evaluó si fermentan o no la lactosa.

Mediante el uso de las pruebas bioquímicas fue posible identificar 16 géneros bacterianos, los cuales fueron: *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas*, *Flavobacterium*, *Photobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Sulfitobacter*.

2.3.3 Cepas aisladas de Playa Esmeralda

De las 90 cepas de bacterias heterótrofas cultivables aisladas para esta localidad, el 94.4% pertenecieron al grupo de las Gram negativas, mientras que el 5.6% pertenecieron al grupo de las Gram positivas (Fig.13). Alrededor del 90% de las cepas fueron positivas para la prueba de catalasa, oxidasa y motilidad. En cuanto a su metabolismo, el 85.5% fueron capaces de oxidar la glucosa, mientras que el 96.6% la fermentaron. De esta manera en su mayoría se trató

de bacterias que presentaron un metabolismo anaerobio facultativo. En cuanto a crecimiento en diferentes concentraciones de sal, el 90% de las bacterias no crecieron en condiciones sin sal, sin embargo se observó un 37.4% de crecimiento en salinidad de 6% y disminuyó a 24.5% en condiciones hipersalinas de 8% de salinidad (Fig.13).

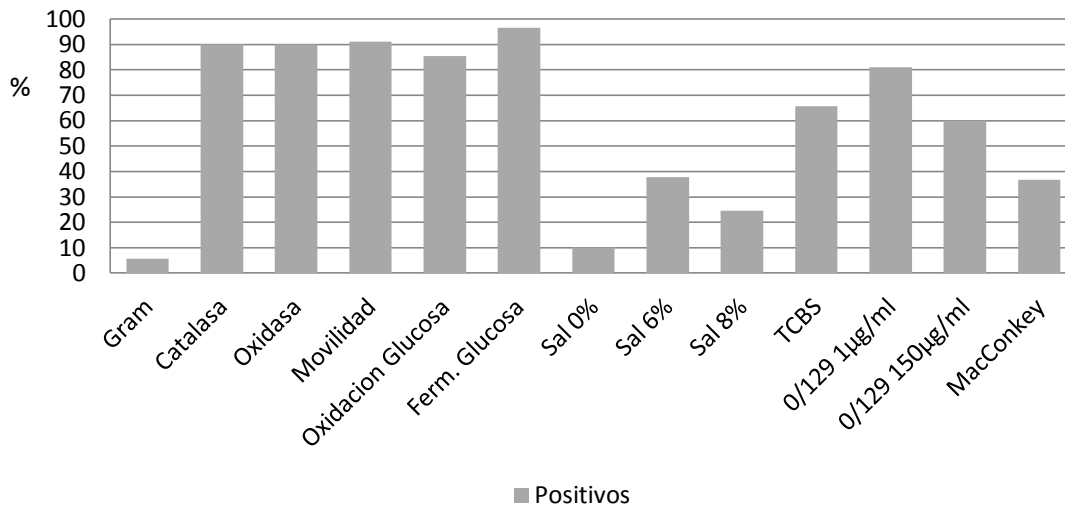


Figura 13. Porcentaje del total de las cepas bacterianas que presentaron crecimiento positivo para las distintas pruebas bioquímicas realizadas.

En cuanto al crecimiento de bacterias en medios selectivos, se observó que el 65.6% de las bacterias crecieron en medio TCBS, del cual el 53% generó colonias de color verde (no fermentadoras de sacarosa) y el 47% bacterias colonias de color amarillo (fermentadoras de sacarosa) (Fig 14a). El crecimiento bacteriano con sensibilidad al agente 0/129 tuvo un crecimiento del 81.1% a una concentración de 10 µg/ml y del 60% a una concentración de 150 µg/ml (Fig. 13). En medio selectivo MacConkey, se observó un crecimiento del 36.7%; de las cuales el 46% fueron colonias de color blanco (no fermentadores de lactosa), el 33% fueron colonias de color rosa (fermentadoras de lactosa) y el 21% no se evaluó el color (Fig. 14b).

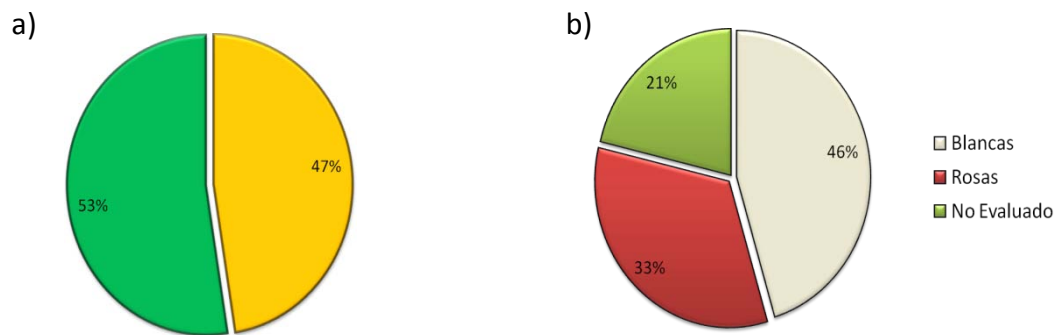


Figura 14. a) Porcentaje de cepas que crecieron en medio selectivo TCBS fermentadoras de sacarosa (amarillas) y no fermentadoras de sacarosa (verdes); b) Porcentaje de cepas que crecieron en medio selectivo MacConkey, fermentadoras de lactosa (color rosa), no fermentadoras de lactosa (blancas) y cepas que no se evaluó si fermentan o no la lactosa.

Mediante las pruebas bioquímicas realizadas, fue posible identificar alrededor de 8 géneros bacterianos, los cuales fueron: *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas*, *Flavobacterium*, *Photobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas* y *Staphylococcus*.

2.3.4 Pruebas moleculares

2.3.4.1 Extracción de DNA genómico

Se seleccionaron 68 cepas bacterianas de las diferentes temporadas y transectos para el aislamiento y purificación del DNA genómico, mediante un Kit de Purificación de DNA (ver metodología). La cantidad de DNA genómico obtenido de las extracciones fue entre 16 - 25µg. Para la mayoría de las muestras se obtuvo una calidad y cantidad de DNA semejantes a las que se presentan en la figura 15.

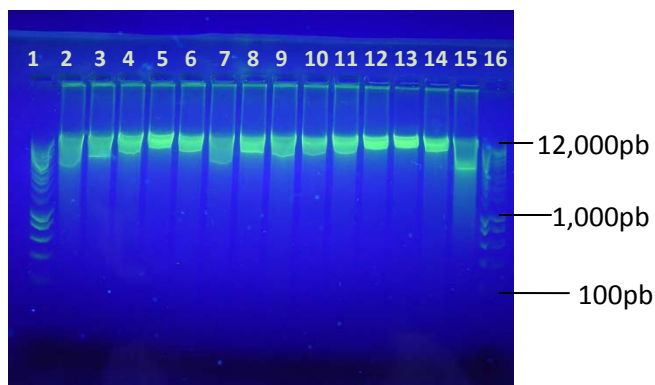


Fig. 15. Purificación de DNA genómico bacteriano observado mediante electroforesis de un gel de agarosa al 1%. El carril 1 y 16 muestran la escalera de 1kb plus. Las muestras del carril 2 al 15 muestran el DNA bacteriano.

2.3.4.2 Amplificación y purificación de productos de PCR del gen ribosomal 16S

De las 68 cepas bacterianas seleccionadas, a 55 cepas se les amplificó el gen ribosomal 16S para su identificación mediante el uso de los primers forward 8F y reverse 1492R. Para las 14 cepas restantes el gen fue amplificado utilizando los primers forward 27F y reverse 785R. Fue necesario utilizar 2 juegos de primers debido a que no todas las bacterias amplificaban con el primer par (8F – 1492R). Los primers 8F – 1492 amplificaron fragmentos de alrededor de 1,300pb, mientras que el juego de primers 27F – 785pb, amplificaron fragmentos de alrededor de 750pb (Fig. 16a).

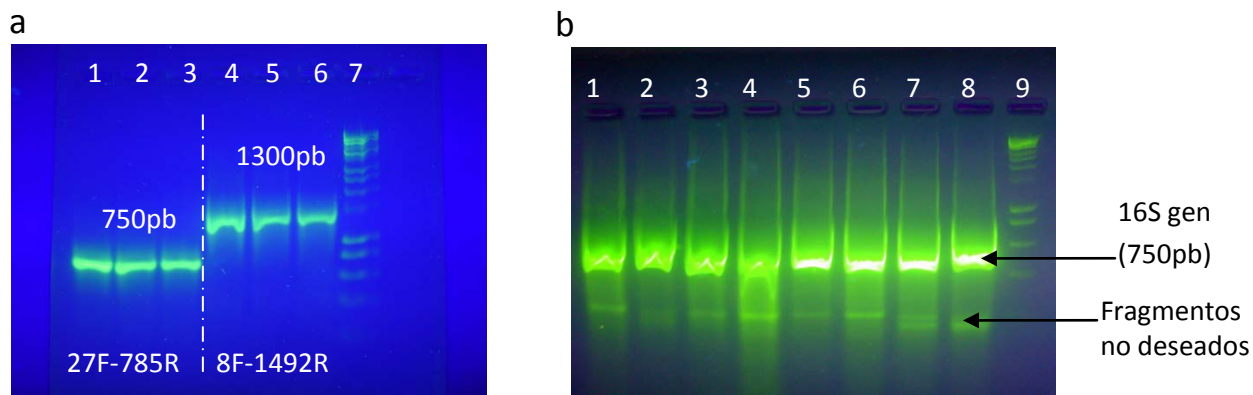


Figura 16. Amplificación del gen ribosomal 16S mediante PCR. a) amplificación utilizando los primers 27F-785R (750pb) pozos del 1 al 3 y utilizando los primers 8F-1492R (fragmento de 1300pb) pozos del 4 al 6; pozo 7 escalera de 1,000pb. b) amplificación con los primers 27F-785R (fragmento de 750pb) con aparición de bandas de menor tamaño (< 300pb). Las muestras incluyen de los pozos 1 al 8, y el pozo 9 es la escalera de 1,000 pb. Geles de agarosa al 1%, teñido con SYBRgreen.

A pesar de que se obtuvo una gran cantidad de productos de PCR del gen ribosomal 16S, también se amplificaron pequeños fragmentos de DNA en algunos casos menores a 400pb, los cuales se generaron con ambos juegos de primers (Fig. 16b). Se realizaron modificaciones a las condiciones de PCR para eliminar estos fragmentos pero no se tuvo éxito. De esta manera, se procedió a purificar el fragmento del gen ribosomal 16S mediante el corte y extracción de la banda del gel, utilizando un kit de purificación en gel (ver metodología). Este método resulto ser muy eficaz, ya que se obtuvo un grado de purificación cercano al 100% (sin contaminación por bandas) con cantidades de DNA entre 8 y 10 μ g para la mayoría de las cepas (en algunos casos fue necesario repetir la amplificación por PCR y la purificación por extracción de banda del gel (Fig. 17).

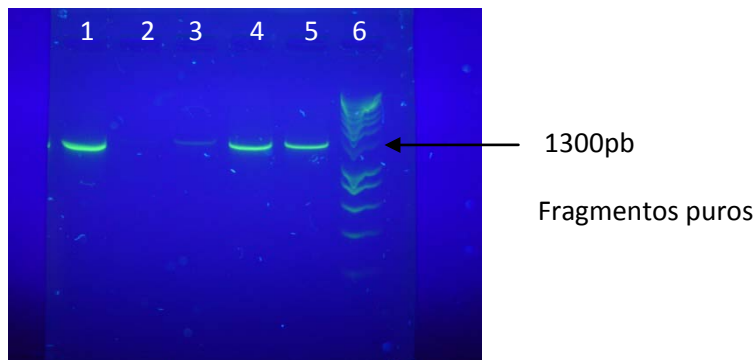


Figura 17. Purificación de productos de PCR del gen ribosomal 16S mediante extracción de banda del gel. Pozos del 1 al 5 muestras de rDNA 16S (1300pb) después de la purificación por extracción de banda de gel. El pozo 6 corresponde a la escalera de 1,000pb. Gel de agarosa al 1%, teñido con SYBRgreen.

2.3.5 Secuenciación y construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR purificados no fueron en algunos casos de la calidad deseada, fragmentos de buena calidad en la secuencia diferían en tamaños en las distintas cepas y fue necesario un trabajo de edición para lograr igualar tamaños semejantes de las secuencias para su alineación mediante BLAST en el GeneBank y el RDP (Ribosomal DataBase Project). Debido a esto, las secuencias amplificadas con el primers 8F fueron separadas en 4 grupos para el alineamiento y construcción de los árboles filogenéticos (Tabla 3). De igual manera, las secuencias amplificadas con el primer 785R fueron separadas en 3 grupos (Tabla 4).

Tabla 3. Grupos de separación de secuencias por tamaños para su alineación por BLAST y construcción de árboles filogenéticos para su identificación. Secuencias amplificadas con el primer 8F.

Tamaño de secuencias	Código de la cepa	Tamaño de secuencias	Código de la cepa
Grupo 1		Grupo 3	
De 100 a 200pb	3PBB1z0310.10	De 300 a 400pb	1PBP4z1108.1
	3PBB1z0310.11		1PBP4z1108.6
	1PBA1z0310.1		3PB12.4
	1PBA1z0310.3		3PB12.5
	3PBB1z0310.3		3PB12.6
	3PBB1z0310.8		3PB12.7
	3PB22.10		3PB12.8
	3PB23.7		3PB22.9
	1PBA5z1108.1		3PB23.5
			3PB23.9
Grupo 2		Grupo 4	
De 200 a 300pb	1PBB1z0310.7	De 450 a 550pb	3PB12.3
	1PBB1z0310.8		3PB23.2
	1PBB1z0310.9		3PB14.7
	1PBB2z0310.3		3PB23.1
	3PB22.6		3PB14.5
	3PB23.6		3PB14.6
	3PB23.8		
	PB2z1207.1		
	1PBP3z1108.8		
	1PBP3z1108.2		
5PBA3z0409.1			

Tabla 4. Grupos de separación de secuencias por tamaños para su alineación por BLAST y construcción de árboles filogenéticos para su identificación. Secuencias amplificadas con el primer 785R.

Tamaño de secuencias	Código de la cepa	Tamaño de secuencias	Código de la cepa
Grupo 1		Grupo 3	
De 260 a 350pb	3PBA4z0409.5 PB2z1207.14 1PBA1z0409.5 1PBP4z0409.13 1PBA5z0409.9	De 700 a 750pb	PB2z1207.9 PB2z1207.10 PB2z1207.12 PB2z1207.15
Grupo 2			
De 500 a 600pb	PB3z1207.10 PB3z1207.11 PB3z1207.2 PB3z1207.4 PB3z1207.5		

2.3.5.1 Identificación bacteriana y construcción de arboles filogenéticos

2.3.5.1.1 Cepas bacterianas secuenciadas con el primer 8F

De las bacterias que conformaron el grupo 1 (secuencias de 100 a 200pb), 13 pertenecieron al género *Vibrio*, una al género *Pseudoalteromonas* y una al género *Bacillus* (Fig. 18). De las bacterias que conformaron el grupo 2 (secuencias de 200 a 300pb), 11 pertenecieron al género *Vibrio*, dos al género *Photobacterium*, tres al género *Pseudoalteromonas*, una al género *Pseudomonas* y una al género *Sulfitobacterium* (Fig. 19). En cuanto a las bacterias que conformaron el grupo 3 (secuencias de 300 a 400pb), 13 pertenecieron al género *Vibrio* y dos al género *Pseudoalteromonas* (Fig. 20). Por último, las bacterias que conformaron el grupo 4 (secuencias de 450 a 550), todas pertenecieron al género *Vibrio* (Fig. 21).

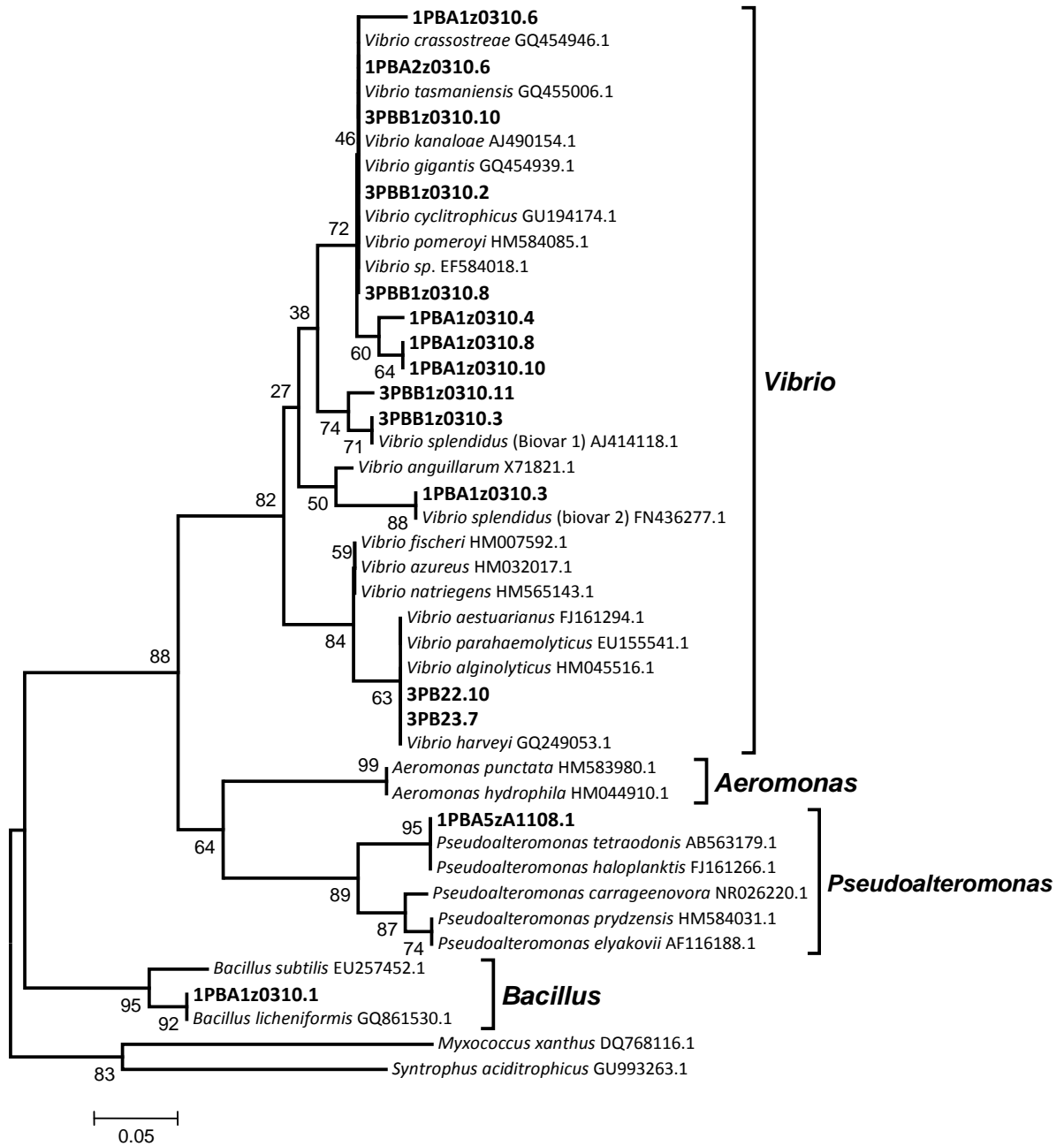


Figura 18. Árbol filogenético del gen 16S rDNA de secuencias entre 100 y 200pb de cepas bacterianas aisladas de Punta Baja. El arreglo se realizó mediante el método de distancia nucleotídica (p-distance), utilizando el algoritmo neighbour-joining con 1,000 repeticiones de remuestreo (bootstrap). Los números a la derecha de cada especie bacteriana representan los códigos de acceso a su secuencia en el GenBank.

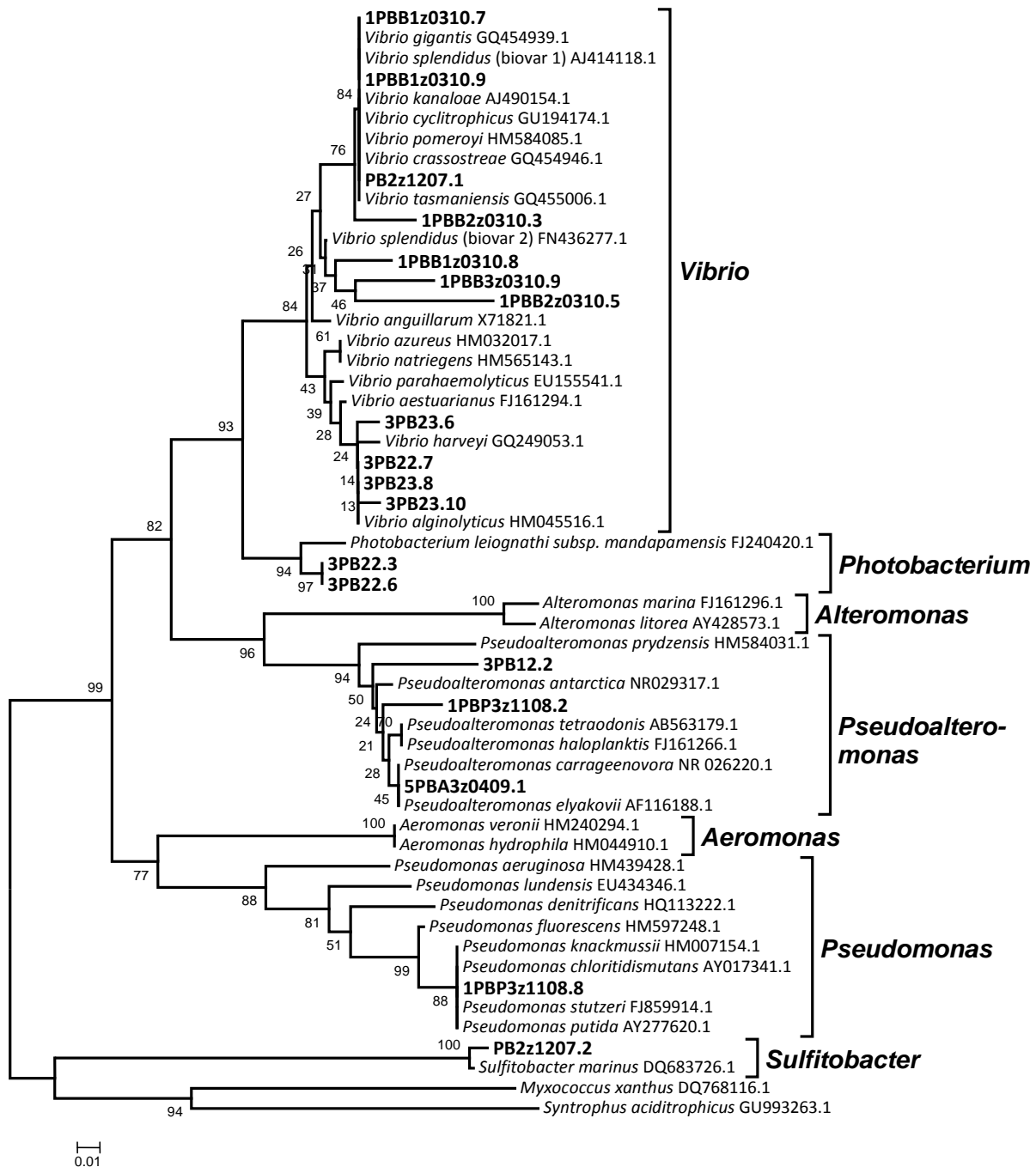


Figura 19. Árbol filogenético del gen 16S rDNA de secuencias entre 200 y 300pb de cepas bacterianas aisladas de Punta Baja. El arreglo se realizó mediante el método de distancia nucleotídica (p-distance), utilizando el algoritmo neighbour-joining con 1,000 repeticiones de remuestreo (bootstrap). Los números a la derecha de cada especie bacteriana representan los códigos de acceso a su secuencia en el GenBank.

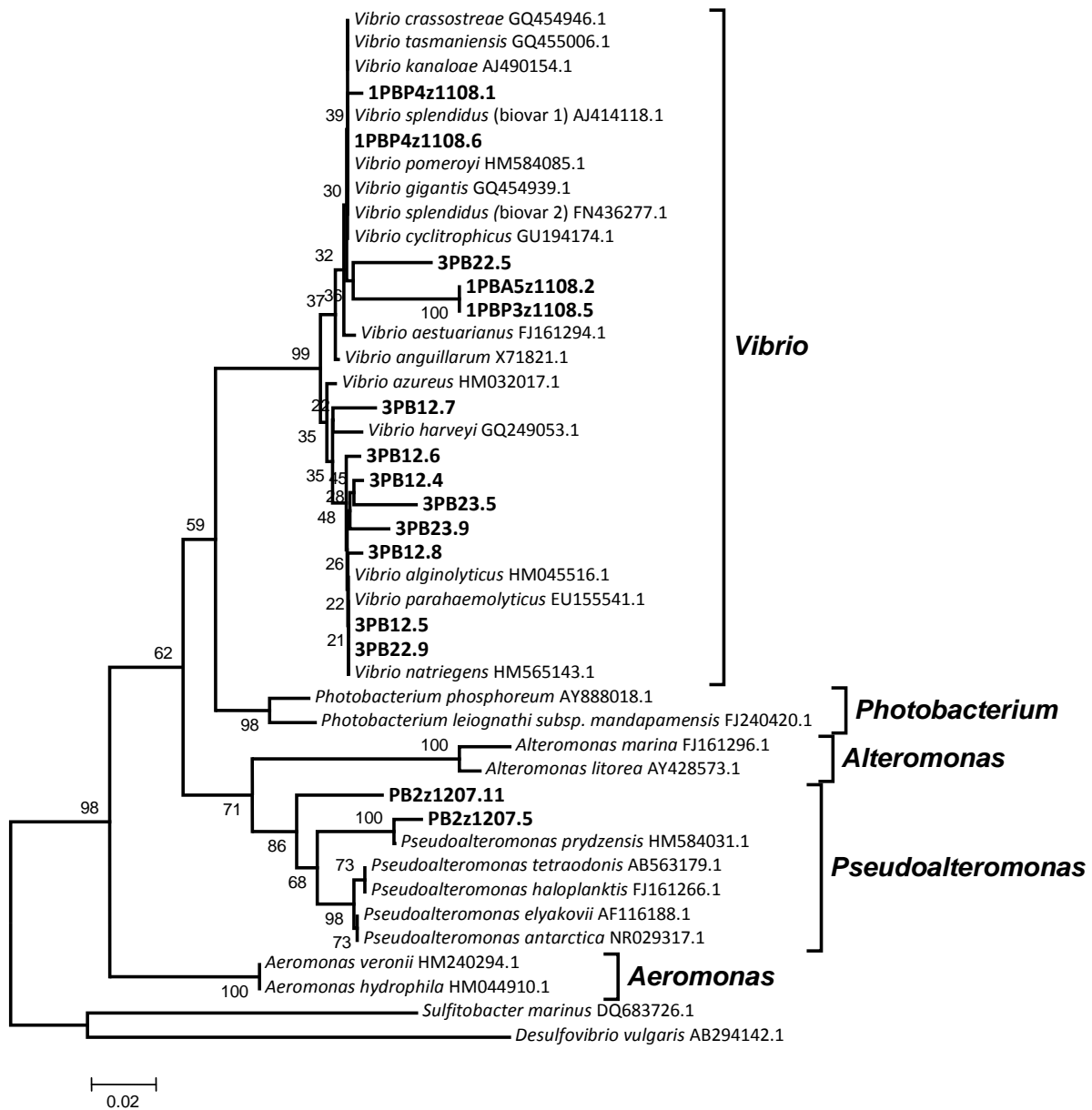


Figura 20. Árbol filogenético del gen 16S rDNA de secuencias entre 300 y 400pb de cepas bacterianas aisladas de Punta Baja. El areggllo se realizó mediante el método de distancia nucleotídica (p-distance), utilizando el algoritmo neighbour-joining con 1,000 repeticiones de remuestreo (bootstrap). Los números a la derecha de cada especie bacteriana representan los códigos de acceso a su secuencia en el GenBank.

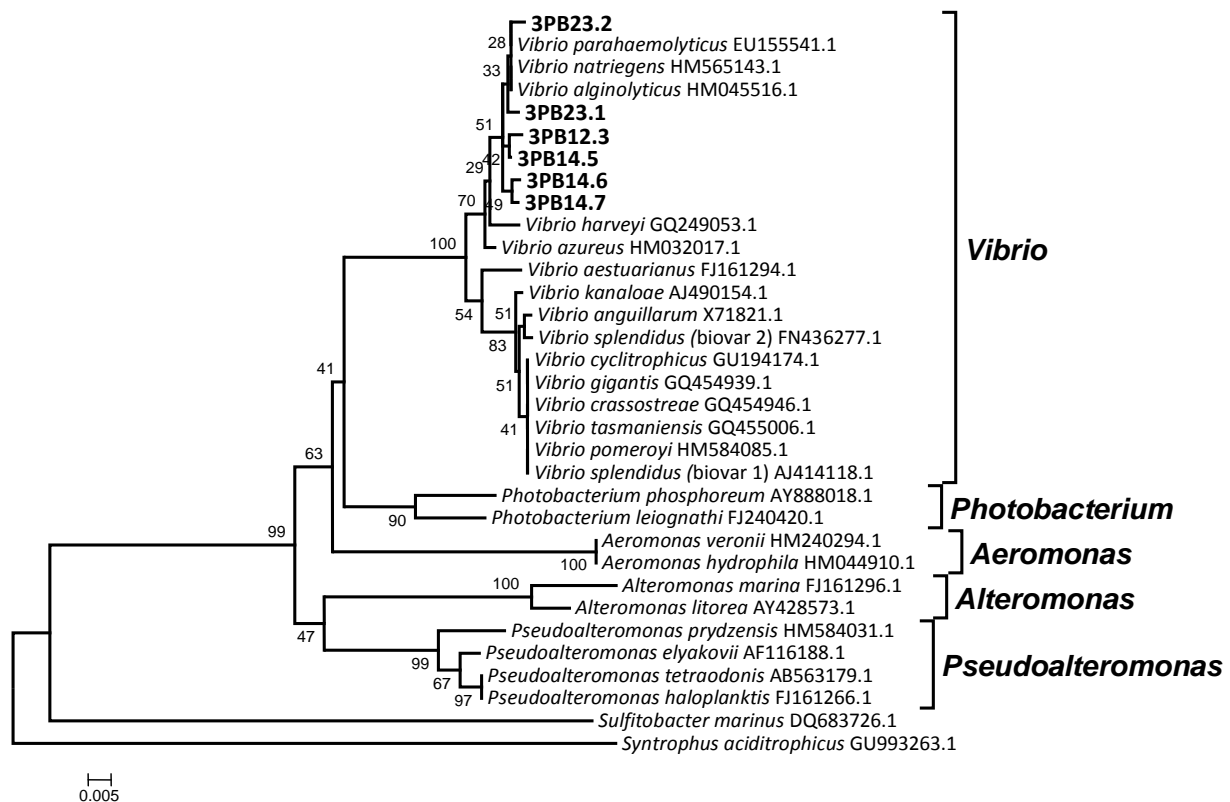


Figura 21. Árbol filogenético del gen 16S rDNA de secuencias entre 450 y 550pb de cepas bacterianas aisladas de Punta Baja. Realizado mediante el método de distancia nucleotídica (p-distance), utilizando el algoritmo neighbour-joining con 1,000 repeticiones de remuestreo (bootstrap). Los números a la derecha de cada especie bacteriana representan los códigos de acceso a su secuencia en el GenBank.

2.3.5.1.2 Cepas bacterianas secuenciadas con el primer 785R

De las bacterias que componen el grupo 1 (secuencias de 260 a 350pb), una cepa perteneció al género *Vibrio*, mientras que las cuatro cepas restantes correspondieron al género *Pseudoalteromonas* (Fig. 22). En cuanto a las bacterias del grupo 2 (secuencias de 500 a 600pb), dos cepas pertenecieron al género *Vibrio* y tres al género *Pseudoalteromonas* (Fig. 23). Finalmente, para el grupo 3 (secuencias de 700 a 750pb), dos cepas correspondieron al género *Vibrio*, una cepa al género *Pseudoalteromonas* y una cepa al género *Bacillus* (Fig.24).

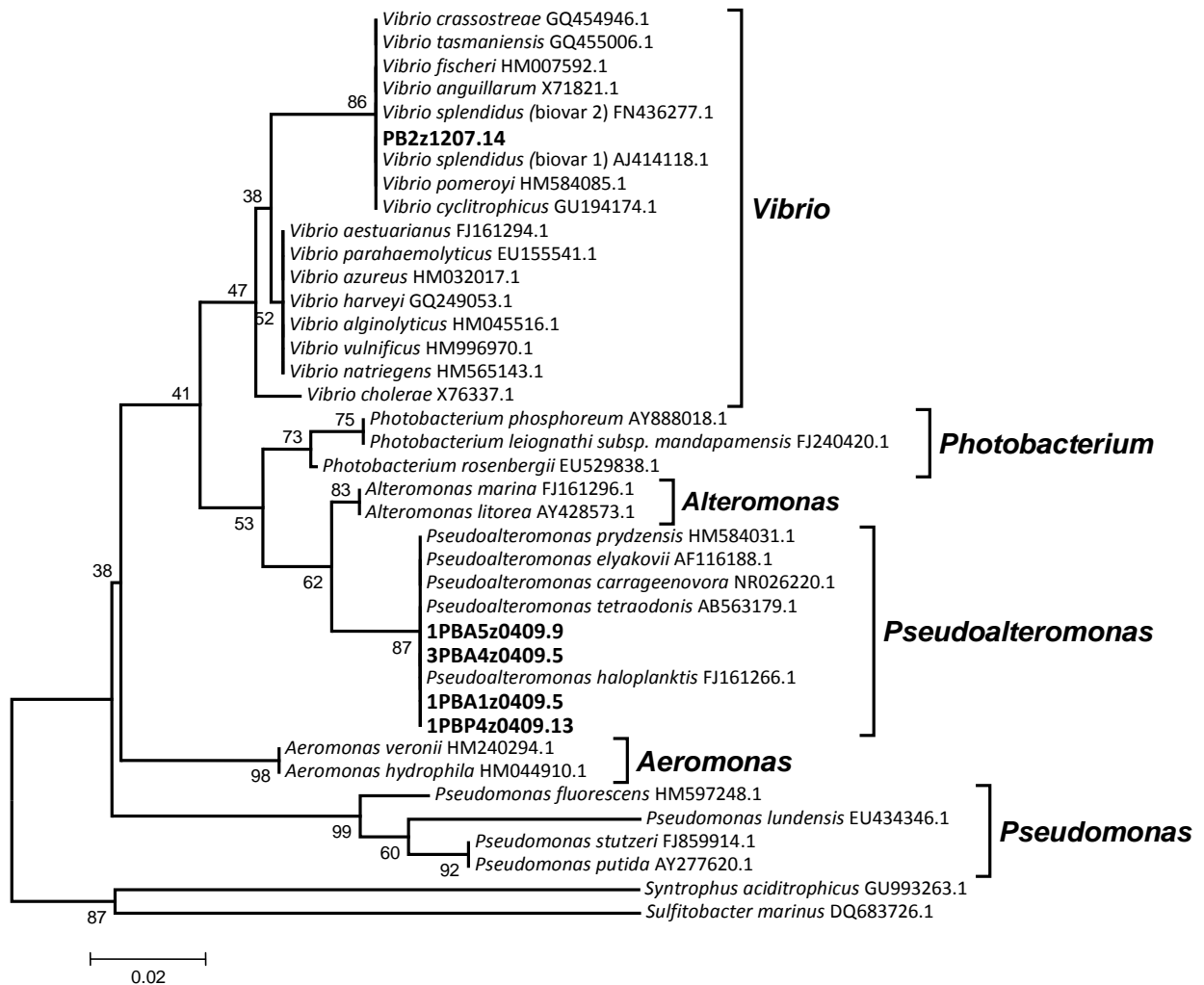


Figura 22. Árbol filogenético basado en el gen 16S rDNA de secuencias entre 260 y 350pb. El árbol se realizó mediante el método de distancia nucleotídica (p-distance), utilizando el algoritmo neighbour-joining con 1,000 repeticiones de remuestreo (bootstrap). Los números a la derecha de cada especie bacteriana representan los códigos de acceso a su secuencia en el GenBank. Bacterias aisladas de la localidad de Playa Esmeralda.

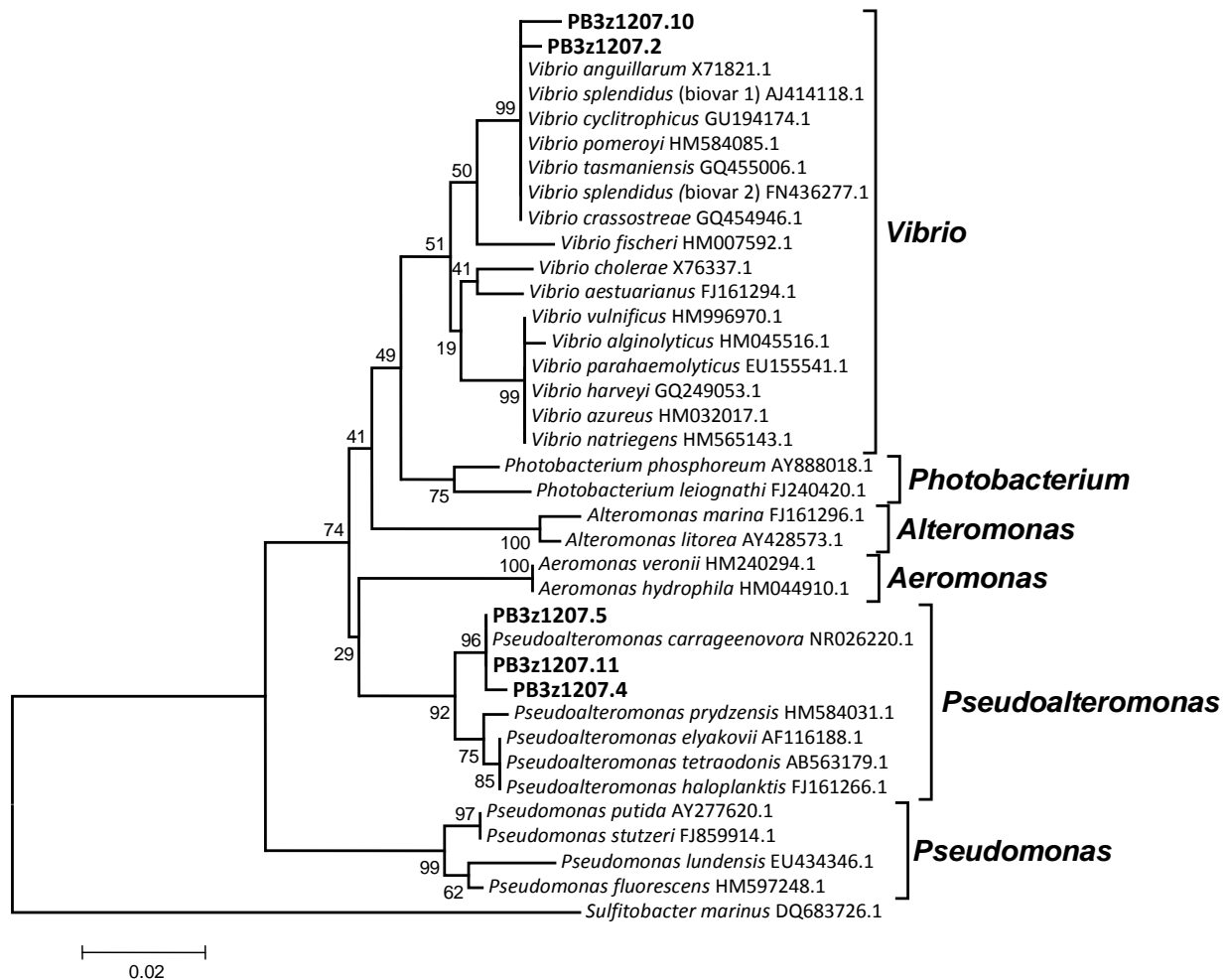


Figura 23. Árbol filogenético basado en el gen 16S rDNA de secuencias entre 500 y 600pb. El árbol se realizó mediante el método de distancia nucleotídica (p-distance), utilizando el algoritmo neighbour-joining con 1,000 repeticiones de remuestreo (bootstrap). Los números a la derecha de cada especie bacteriana representan los códigos de acceso a su secuencia en el GenBank. Bacterias aisladas de la localidad de Playa Esmeralda.

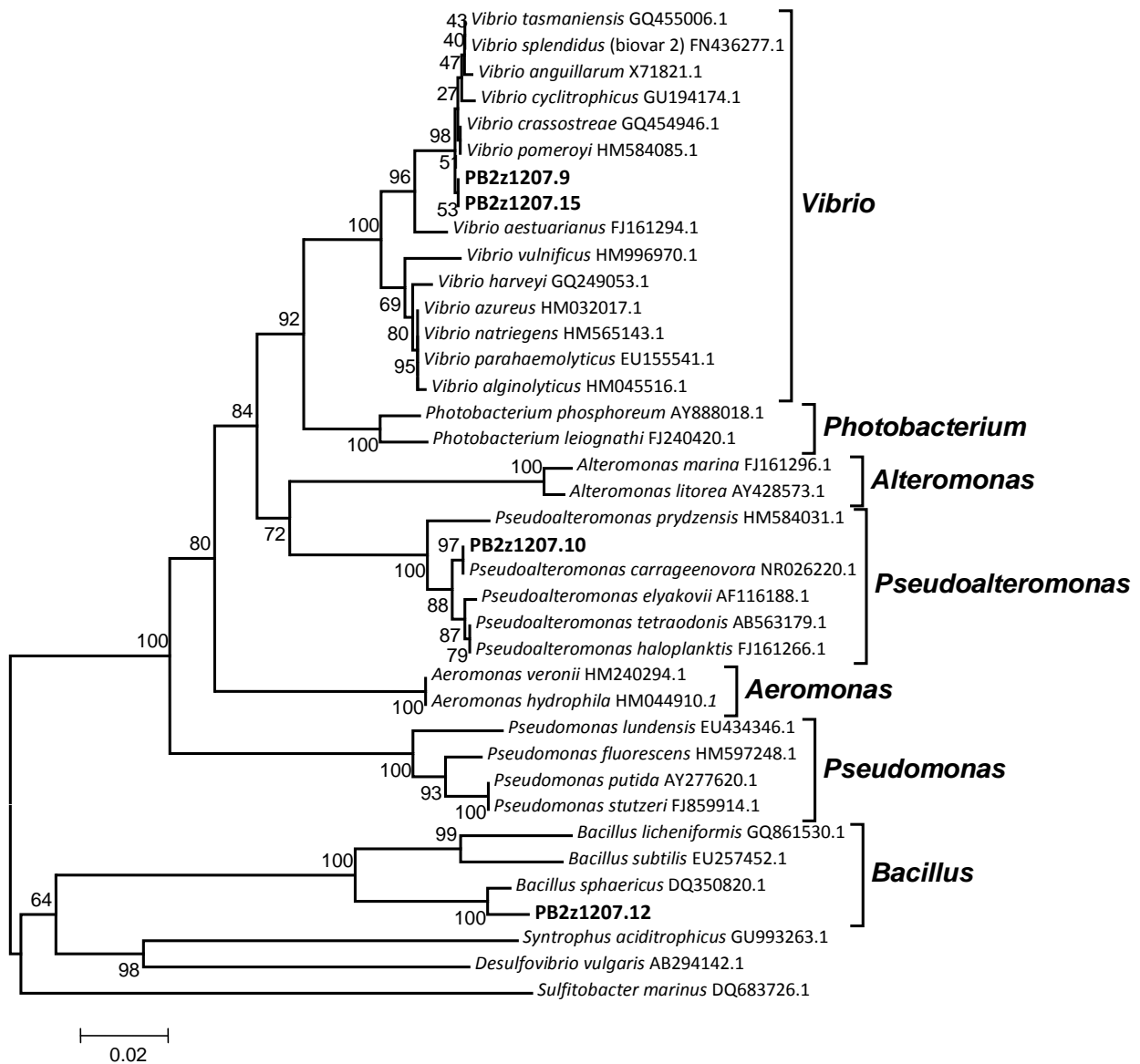


Figura 24. Árbol filogenético basado en el gen 16S rDNA de secuencias entre 700 y 750pb. El árbol se realizó mediante el método de distancia nucleotídica (p-distance), utilizando el algoritmo neighbour-joining con 1,000 repeticiones de remuestreo (bootstrap). Los números a la derecha de cada especie bacteriana representan los códigos de acceso a su secuencia en el GenBank. Bacterias aisladas de la localidad de Playa Esmeralda.

2.3.6 Géneros bacterianos presentes en Punta Baja y Playa Esmeralda

Para la localidad de Punta Baja, se aislaron un total de 393 cepas bacterianas de marzo del 2007 a marzo del 2010, de las cuales 338 cepas fueron identificadas por métodos bioquímicos y 55 cepas por métodos moleculares. Se identificaron un total de 16 géneros bacterianos (Fig. 25). Las bacterias más representativas para esta localidad fueron del género *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* (33 y 30%, respectivamente). Bacterias del género *Halomonas*, *Flavobacterium* y *Photobacterium* tuvieron una representatividad del 12, 8 y 5%, respectivamente. También se encontraron géneros en menor proporción que constituyeron menos del 3% del total de las cepas, entre los que se encontraron: Enterobacterias, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Sulfitobacter*. Así mismo, alrededor del 1.2% del total de las cepas no fue posible su identificación (Fig.25).

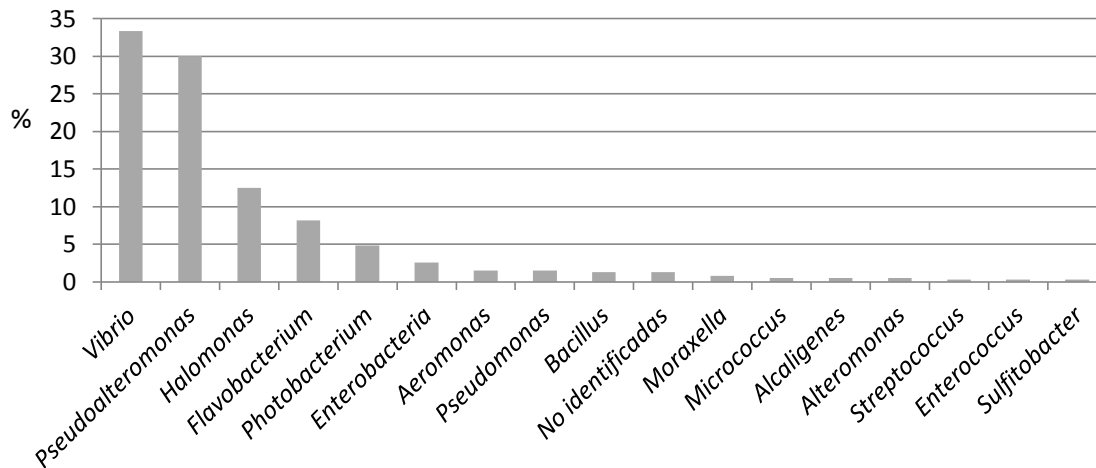


Figura 25. Proporción de géneros bacterianos encontrados de un total de 393 cepas aisladas en la localidad de Punta Baja, Baja California, México, entre marzo del 2007 y marzo del 2010.

Para la localidad de Playa Esmeralda, se aislaron un total de 90 cepas bacterianas entre noviembre del 2008 y marzo del 2010; las cuales en su totalidad fueron identificadas por métodos bioquímicos. Se identificaron un total de ocho géneros bacterianos, siendo el más abundante el género *Vibrio* con un 57% (Fig. 26).

Le continúan bacterias del género *Halomonas* con un 16%, seguido por bacterias del género *Pseudoalteromonas* con un 10%. Bacterias del género *Flavobacterium* y *Aeromonas* estuvieron presentes en un 5.5%, así como del género *Photobacterium* con un 4%. Bacterias que solamente fueron aisladas en una ocasión y representan el 1% del total de las cepas correspondieron a los géneros *Enterobacteria* y *Sthaphylococcus* (Fig. 26).

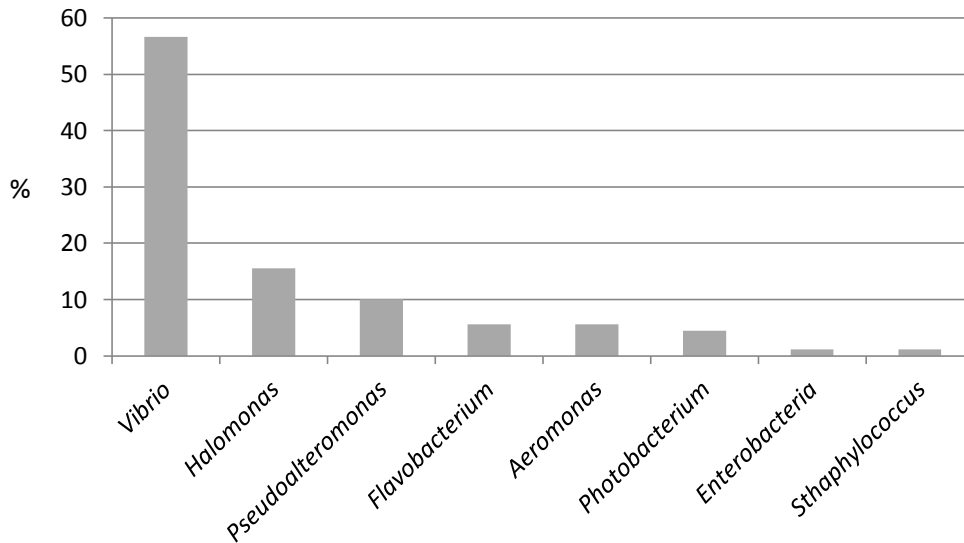


Figura 26. Proporción de géneros bacterianos encontrados de un total de 90 cepas aisladas en la localidad de Playa Esmeralda, Baja California, México, entre noviembre del 2008 y marzo del 2010.

2.3.7 Análisis espacio-temporal de la diversidad de géneros bacterianos en Punta Baja y Playa Esmeralda

2.3.7.1 Análisis espacial en la localidad de Punta Baja

El análisis espacial para determinar la diversidad de géneros bacterianos por sustrato en los diferentes transectos y zonas del intermareal, se llevó a cabo mediante el coeficiente de similitud de Jaccard considerando la ausencia-presencia de géneros bacterianos. Para la temporada del 2007, la composición de grupos bacterianos aislados exclusivamente de pozas de intermareal varió entre los meses de marzo y diciembre para la mayoría de los sustratos; sin embargo para el alga *C. vancouverensis* fue similar en un 80% en ambas temporadas. Además

los géneros bacterianos identificados entre las muestras de *M. californianus* y el alga *Plocamium* sp. fueron totalmente diferentes que las encontradas en *S. purpuratus*, *C. vancouverensis* y *L. californicum* (Fig.27A). Por otro lado, también se observó que la composición de géneros bacterianos de *S. purpuratus* y *C. vancouverensis* aislados del transecto 5 presentaron una similitud del 80% (Fig. 27B).

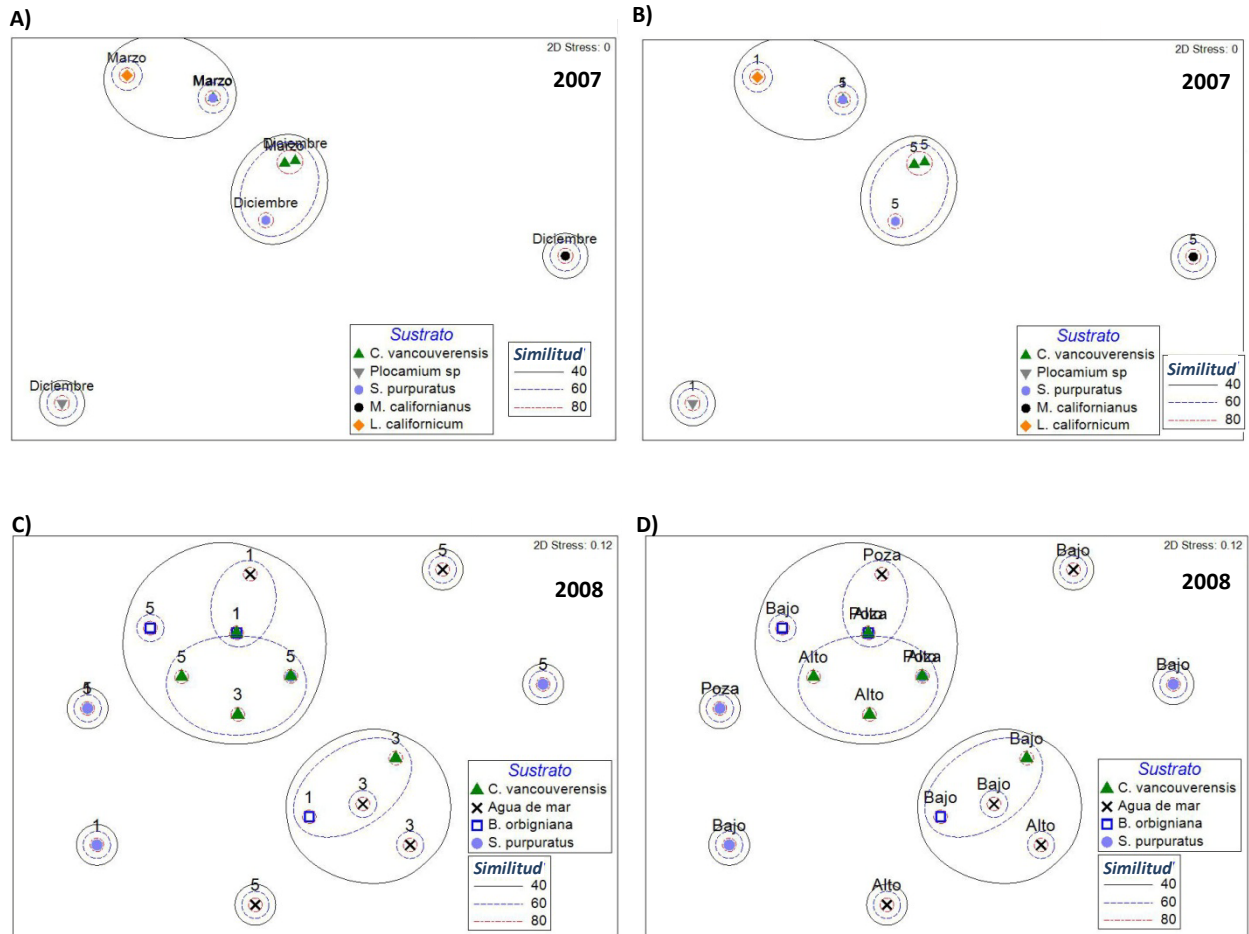


Figura 27. Análisis espacial de la diversidad de géneros bacterianos representada en MDS mediante el coeficiente de similitud de Jaccard para muestras bacterianas aisladas de la localidad de Punta Baja. A) muestras aisladas en la temporada del 2007 durante marzo y diciembre en pozas de intermareal; B) transectos de donde se aislaron las muestras en la temporada de marzo y diciembre del 2007; C) muestras aisladas de los diferentes transectos en la temporada del 2008 durante marzo y diciembre; D) muestras aisladas de marzo y diciembre del 2008 en las diferentes zonas del intermareal. Los números en las gráficas representan el número de transecto de donde se aislaron las cepas. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

Para la temporada del 2008, se encontró que la composición de géneros bacterianos aislados de *C. vancouverensis* fue muy similar entre los diferentes transectos y zonas del intermareal (80%), de esta manera no se observó que existiera una variación espacial (Fig. 27C). Por otro lado, se encontró que la composición de géneros bacterianos fue muy variable en *S. purpuratus*, agua de mar y *B. orbigniana* entre los diferentes transectos y zonas del intermareal (Fig. 27C y D). Para la temporada del 2009, se observó que la composición de géneros bacterianos de *S. purpuratus* presentó una similitud de alrededor del 50% entre la zona alta y la poza de los transectos 3 y 1, sólo la muestra de la poza de intermareal del transecto 5 resultó significativamente diferente al resto de las muestras (Fig. 28A y B). En relación a los géneros bacterianos del alga *C. vancouverensis* se observó que la mayoría de las muestras presentaron una alta similitud entre los diferentes transectos y sustratos, en donde solo las muestras de la zona baja del transecto 3 y la poza de intermareal del transecto 1, difirieron en su composición de géneros (Fig. 28A y B). Para las muestras de agua de mar, se presentó algo similar a lo observado en *C. vancouverensis* (Fig. 28A y B), sin embargo se observó que la muestra de la poza de intermareal del transecto 1 fue totalmente diferente al resto, pero en general fueron muy similares en cuanto a su composición de géneros bacterianos. Las muestras del alga *L. pacifica* presentó los mismos géneros bacterianos que *C. vancouverensis*, la única diferencia fue que se aislaron de transectos y zonas diferentes (Fig. 28A y B).

Las muestras aisladas del alga *B. orbigniana* presentaron una similitud en composición de géneros bacterianos del 60% con respecto a la muestra de agua de mar, los cuales también fueron aislados de diferentes zonas del intermareal y diferentes transectos (Fig.28A y B). Por último, la composición de géneros aislados de *M. californianus* presentaron una alta variación espacial, sin embargo la muestra del transecto 1 de la zona alta, presentó una similitud del 60% con aquellas asiladas del alga *C. vancouverensis* (Fig.28A y B).

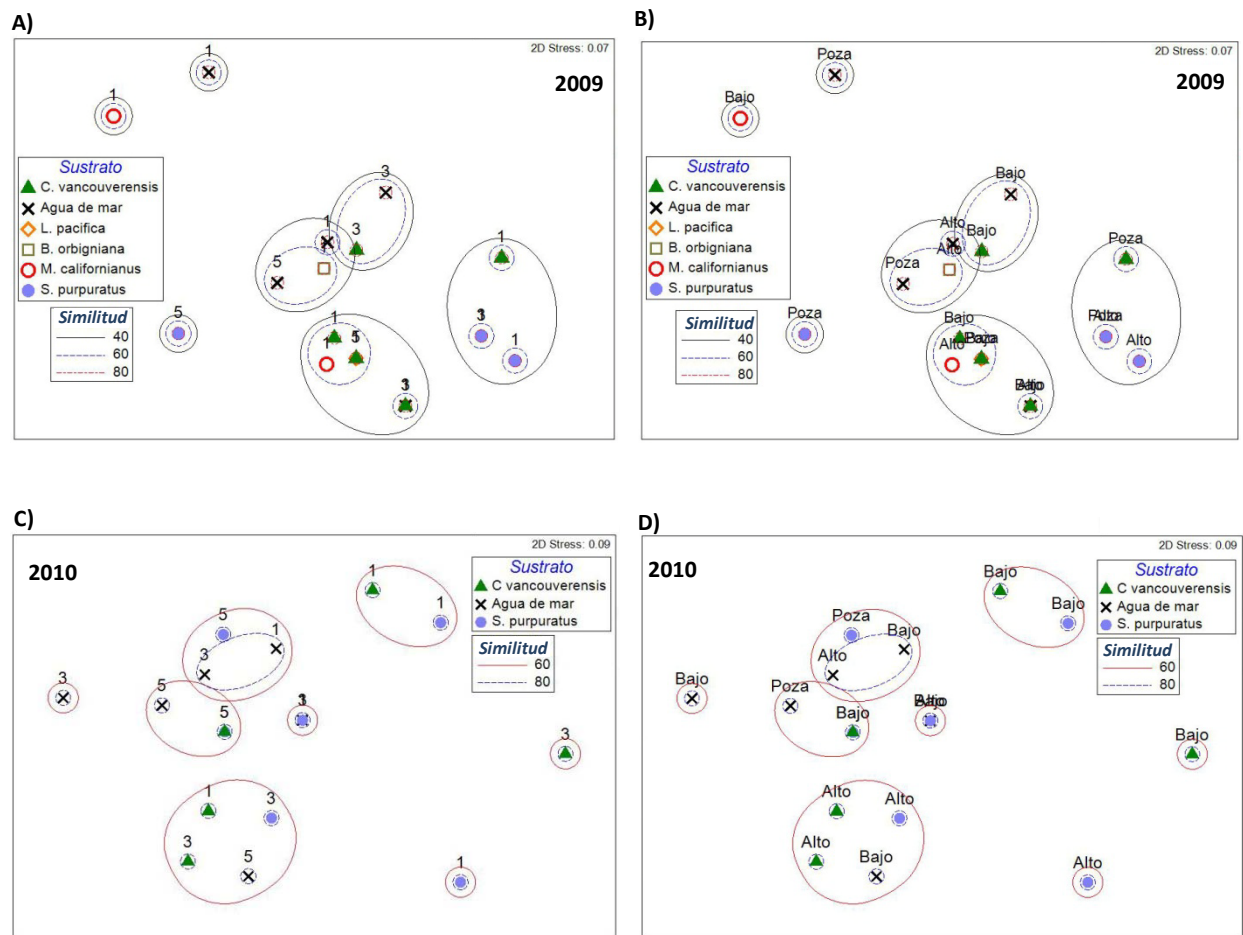


Figura 28. Análisis espacial de la diversidad de géneros bacterianos representado en MDS mediante el coeficiente de similitud de Jaccard para muestras bacterianas aisladas de la localidad de Punta Baja. A) transectos de las muestras aisladas durante la temporada del 2009; B) muestras aisladas del 2009 en las diferentes zonas del intermareal; C) transectos de las muestras aisladas durante la temporada del 2010; D) muestras aisladas del 2010 en las diferentes zonas del intermareal. Los números en las gráficas representa el transecto de donde se aislaron las cepas. Los círculos de similitud esta representado en porcentajes.

Para la temporada del 2010, se observó que la composición de géneros bacterianos de cada sustrato varió entre las diferentes zonas del intermareal y los diferentes transectos (Fig. 28C y D). Sin embargo, se observó que ciertos grupos de bacterias aislados de diferentes sustratos fueron similares en cuanto a su composición de géneros (Fig. 28C y D). Por ejemplo, en la figura 28C se observa que bacterias aisladas tanto de *C. vancouverensis*, como de *S. purpuratus* y agua de mar presentaron una similitud de géneros del 60% (Fig. 28C y D).

2.3.7.1.2 Análisis temporal para la localidad de Punta Baja

El análisis temporal se realizó mediante la comparación por separado, del total de muestras entre cada una de las temporadas de muestreo. El análisis de la composición de géneros bacterianos entre las temporadas de marzo del 2007, diciembre del 2007 y noviembre del 2008, mostró que la composición de los géneros fue poco similar entre algunos de los sustratos en las tres temporadas (Fig. 29A y B). Las muestras de *C. vancouverensis* de marzo del 2007 fueron 40% similares a las de *S. purpuratus* de noviembre del 2008, así mismo las muestras de *S. purpuratus* de diciembre del 2007 presentaron una similitud del 40% con las muestras de agua de mar, *B. orbigniana* y *C. vancouverensis* del 2008. Por otro lado, se observó que las muestras de *S. purpuratus*, *C. vancouverensis* y *B. orbigniana* presentaron una mayor similitud entre sí que con respecto a las de agua de mar. Las muestras de *M. californianus* presentaron una similitud del 60% a las de *S. purpuratus*. En relación a las muestras del alga *Plocamium sp.*, se observó que su composición de géneros bacterianos fue totalmente diferente al resto de los sustratos (Fig. 29A y B).

El análisis de las temporadas de marzo del 2007, diciembre del 2007 y abril del 2009, mostró una clara diferencia en la composición de géneros bacterianos. Las muestras de *S. purpuratus*, *C. vancouverensis* y *M. californianus* de la temporada de noviembre del 2009, fueron diferentes a la composición de géneros de los mismos sustratos para la temporada de marzo y diciembre del 2007, en donde estas dos últimas presentaron una mayor similitud entre sí. Así mismo, también se observó que la mayoría de las muestras aisladas de erizo morado, presentaron un mayor similitud en su diversidad bacteriana con respecto a las encontradas en la mayoría de las muestras del alga *C. vancouverensis*, aunque también se observaron varias muestras de *C. vancouverensis* que fueron muy similares a las de agua de mar (Fig. 29C y D).

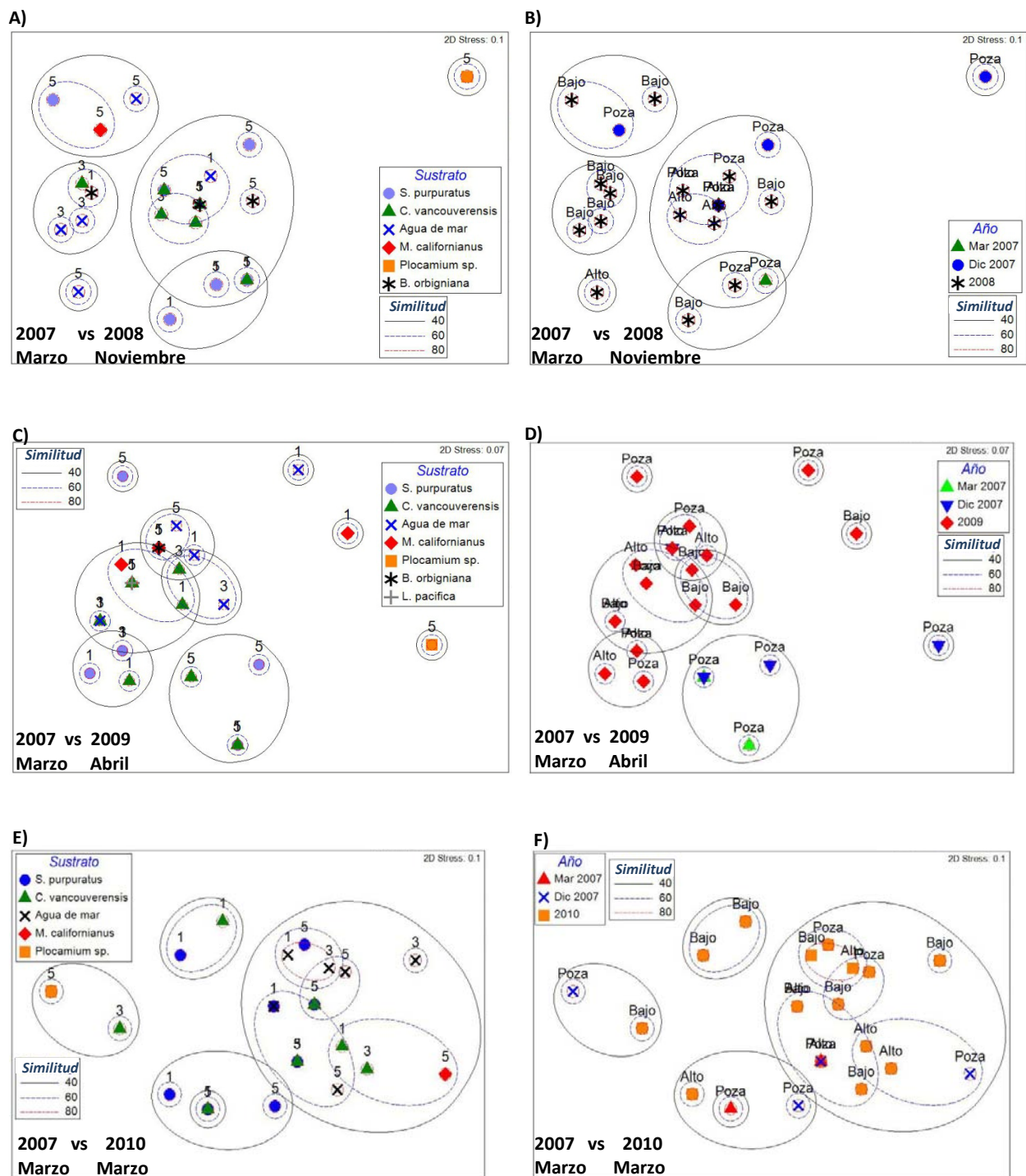


Figura 29. Análisis temporal de la diversidad de géneros bacterianos representados en MDS mediante el coeficiente de similitud de Jaccard para muestras bacterianas aisladas de la localidad de Punta Baja. A y B) diversidad en la composición de géneros bacterianos entre los diferentes sustratos para las muestras de marzo del 2007, diciembre del 2007 y noviembre del 2008; B) el mismo análisis para las muestras de marzo del 2007, diciembre del 2007 y abril del 2009; C) el mismo análisis para las muestras de marzo del 2007, diciembre del 2007 y marzo del 2010. Los números en las gráficas representan el transecto de donde se aislaron las cepas. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

En cuanto al análisis de las temporadas de marzo del 2007 y diciembre del 2007 se observó que la composición de géneros bacterianos fue muy similar a las muestras de algunos sustratos del 2010 (Fig. 29E y F). Se observó que la composición de géneros bacterianos de *S. purpuratus* fue muy similar entre las diferentes temporadas, así como también a la mayoría de las muestras del alga *C. vancouverensis* (Fig. 29E y F).

El análisis en la diversidad de géneros bacterianos en las muestras de noviembre del 2008 en relación con las de abril del 2009, mostró que la mayoría de las muestras aisladas de agua de mar, *C. vancouverensis* y *B. orbigniana* en 2008, presentaron una alta similitud con aquellas del 2009 (Fig. 30A y B). Así mismo, se observó que la composición de géneros bacterianos del alga *C. vancouverensis* fue muy similar para la mayoría de las muestras en las dos temporadas, y también presentó una alta similitud con respecto a muestras de agua de mar principalmente aisladas durante el año 2008. En el caso de las muestras de *S. purpuratus* se observó que difirieron significativamente en su composición de géneros bacterianos en ambas temporadas (Fig. 30A y B). En el análisis temporal de las muestras de noviembre del 2008 y marzo del 2010, se observó que para las muestras de *S. purpuratus* a pesar de que difirieron espacialmente, también mostraron diferencias temporales (Fig. 30B y C); lo mismo se observó para las muestras de agua de mar y *C. vancouverensis*. Es importante señalar que se observaron similitudes en la composición de géneros bacterianos entre ambas temporadas, solo que éstas fueron entre diferentes sustratos; principalmente entre muestras de agua de mar del 2008 con algunas muestras de *C. vancouverensis* del 2010 (Fig. 30B y C).

La composición de géneros bacterianos entre las temporadas de abril del 2009 y marzo del 2010 en general variaron significativamente (Fig. 30E y F). La diversidad bacteriana de cada uno de los sustratos en abril del 2009 tuvo una variación espacial muy alta, esto significa que todas las muestras de *S. purpuratus* fueron muy diferentes entre sí solamente para el 2009, y lo mismo ocurrió para el resto de los sustratos.

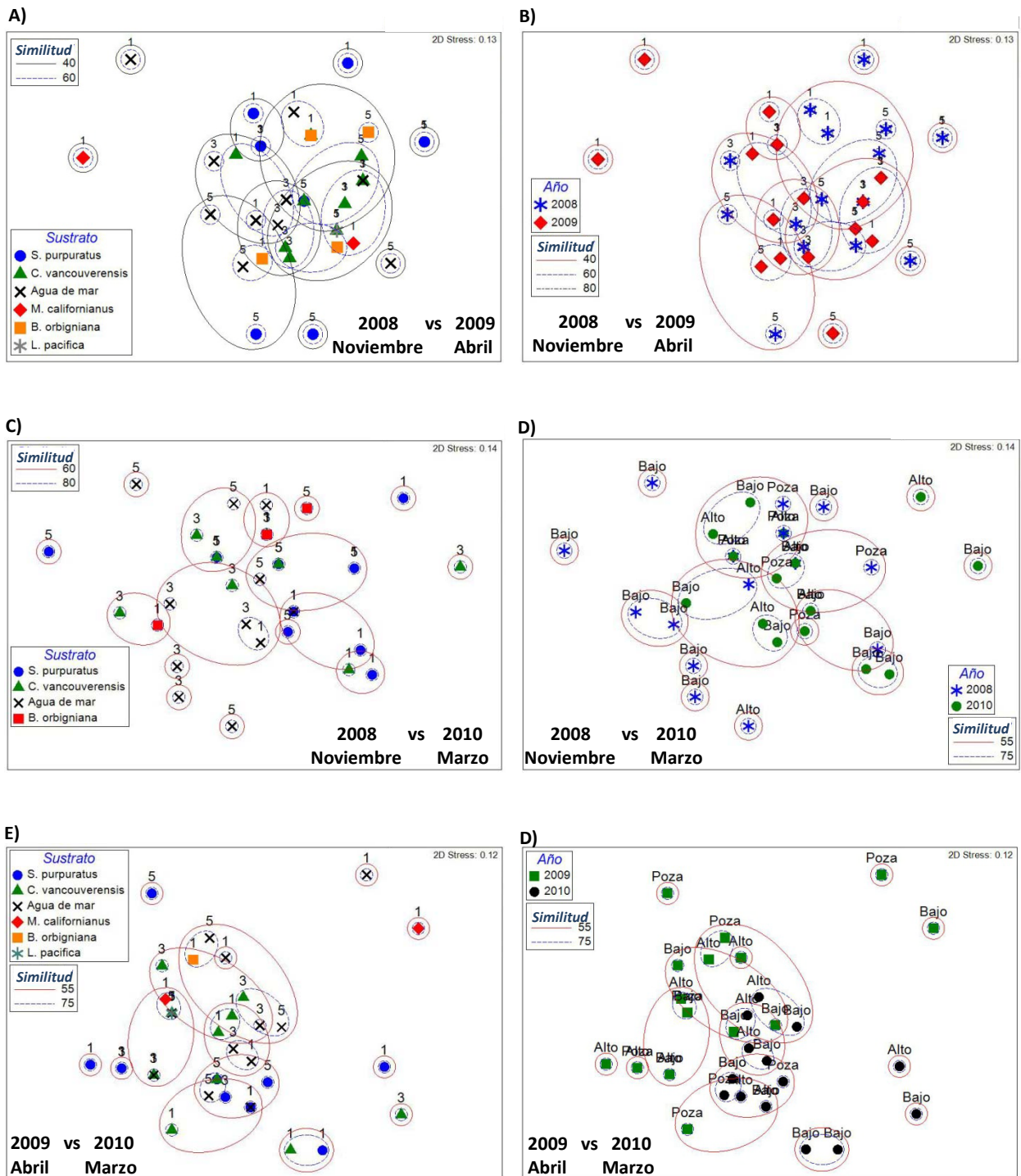


Figura 30. Análisis temporal de la diversidad de géneros bacterianos representados en MDS mediante el coeficiente de similitud de Jaccard para muestras bacterianas aisladas de la localidad de Punta Baja. A y B) diversidad en la composición de géneros bacterianos entre los diferentes sustratos para las muestras de noviembre del 2008 y abril del 2009; B) el mismo análisis para las muestras de noviembre del 2008 y marzo del 2010; C) el mismo análisis para las muestras de abril del 2009 y marzo del 2010. Los números en las gráficas representan el transecto de donde se aislaron las cepas. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

Por otro lado, las muestras de marzo del 2010, tuvieron muy poca variación espacial para cada uno de los sustratos a diferencia de las muestras del 2009; sin embargo se agruparon de manera distante a las muestras del 2009 (Fig. 30E y F).

En general, el análisis en la composición y abundancia de géneros bacterianos para cada sustrato, demostró que para *S. purpuratus* el género más abundante en el 2007, 2008 y 2010 fue *Vibrio* (Fig. 31A, B y D), sin embargo para la temporada del 2009, no se encontró (Fig. 31C). Por otro lado, se identificaron géneros que solamente fueron aislados en ciertas temporadas como: *Sulfitobacter* en 2007, *Bacillus* en 2007 y 2010, *Enterobacteriaceae* en 2008, *Pseudomonas* en 2010 y *Aeromonas* en 2010. Los géneros más comúnmente encontrados en las cuatro temporadas fueron *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas*, *Flavobacterium* y *Photobacterium* (Fig. 31).

Para el alga *C. vancouverensis*, se encontró que igual manera que en el erizo morado, el género más abundante en el 2007, 2008 y 2010 fue *Vibrio*, seguido por el género *Pseudoalteromonas*, el cual fue el más abundante en la temporada del 2009 superando por mucho a *Vibrio* (Fig. 32). El tercer género más abundante encontrado fue *Halomonas*, sin embargo este no se encontró en la temporada del 2007. La mayor cantidad de géneros encontrados fue en la temporada del 2010, en donde se aislaron géneros como *Bacillus*, *Alteromonas*, *Aeromonas* y *Photobacterium*, los cuales fueron los menos abundantes (Fig. 32).

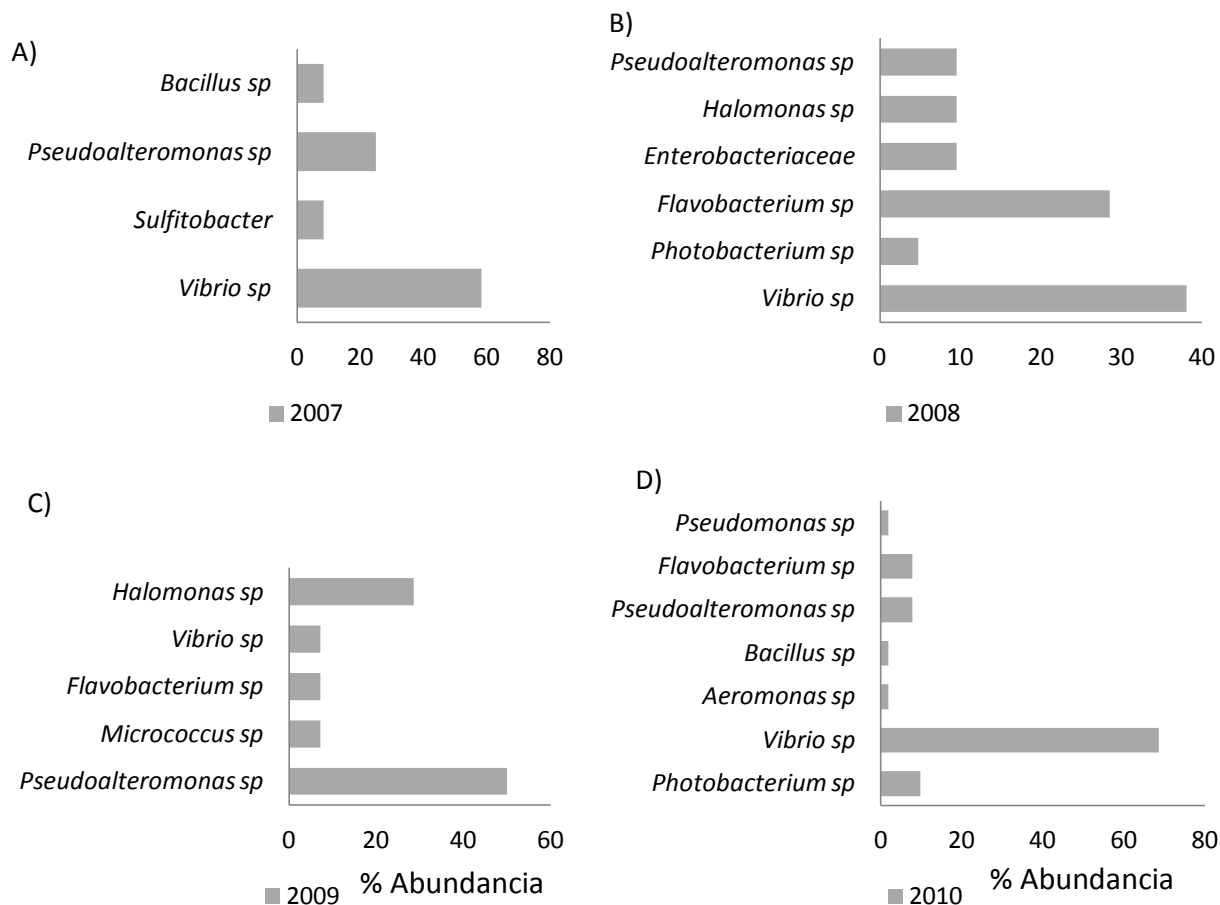


Figura 31. Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de *S. purpuratus* en la localidad de Punta Baja en las diferentes temporadas. A) géneros encontrados en marzo del 2007; B) en noviembre del 2008; C) en abril del 2009; D) en marzo 2010.

En las muestras tomadas de agua de mar, se encontró que en general el género más abundante en 2008 y 2009 fue *Pseudoalteromonas*, y el segundo más común en el 2010 (Fig. 33A y B). El segundo género más abundante fue *Vibrio sp*, aunque cabe resaltar que no fue encontrado en 2008 y en 2009 fue uno de los menos abundantes; en contraste en el 2010 fue el más abundante, con alrededor del 45% (Fig. 33D). El tercer género más abundante fue *Halomonas*, el cual fue encontrado en los tres años de muestreo. También se encontró el género *Moraxella*, el cual no había sido aislado en ningún otro sustrato (Fig. 33B). A diferencia del resto de los sustratos, en agua de mar se aislaron una mayor cantidad de géneros en cada temporada.

B)

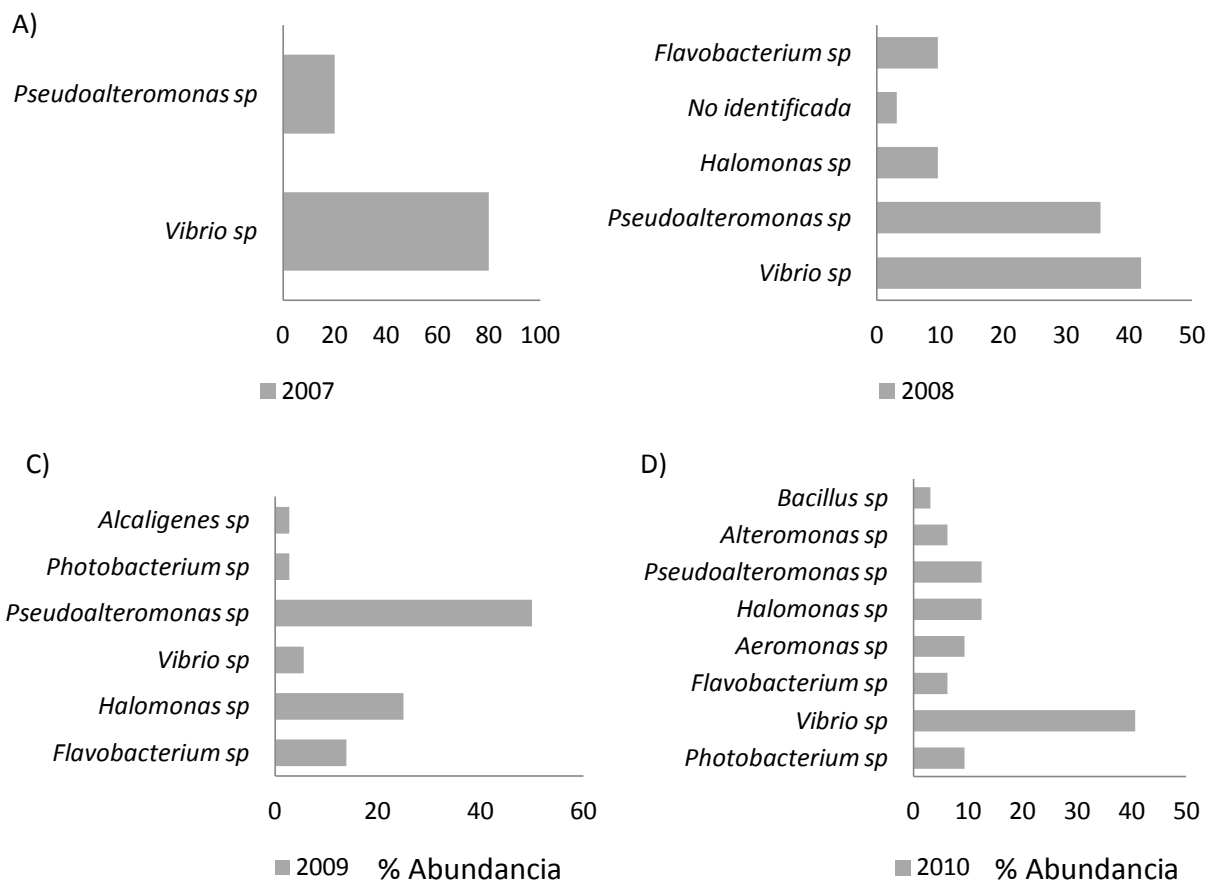


Figura 32. Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de *C. vancouverensis* en la localidad de Punta Baja durante las diferentes temporadas. A) géneros encontrados en marzo del 2007; B) en noviembre del 2008; C) en abril del 2009; D) en marzo del 2010.

Para las muestras de *M. californianus*, se encontró que, a diferencia de los sustratos anteriores, el género más abundante en 2007 fue *Pseudoalteromonas* (Fig. 34A y B); sin embargo para la temporada del 2009, el género más abundante fue *Pseudomonas sp* (Fig. 34B). Sin embargo, éste último no se encontró en el 2007. Cabe resaltar que el género *Halomonas* fue el tercer género más abundante, y fue encontrado en las dos temporadas, a diferencia de *Pseudoalteromonas* y *Pseudomonas* que sólo se encontraron en una temporada (Fig. 34).

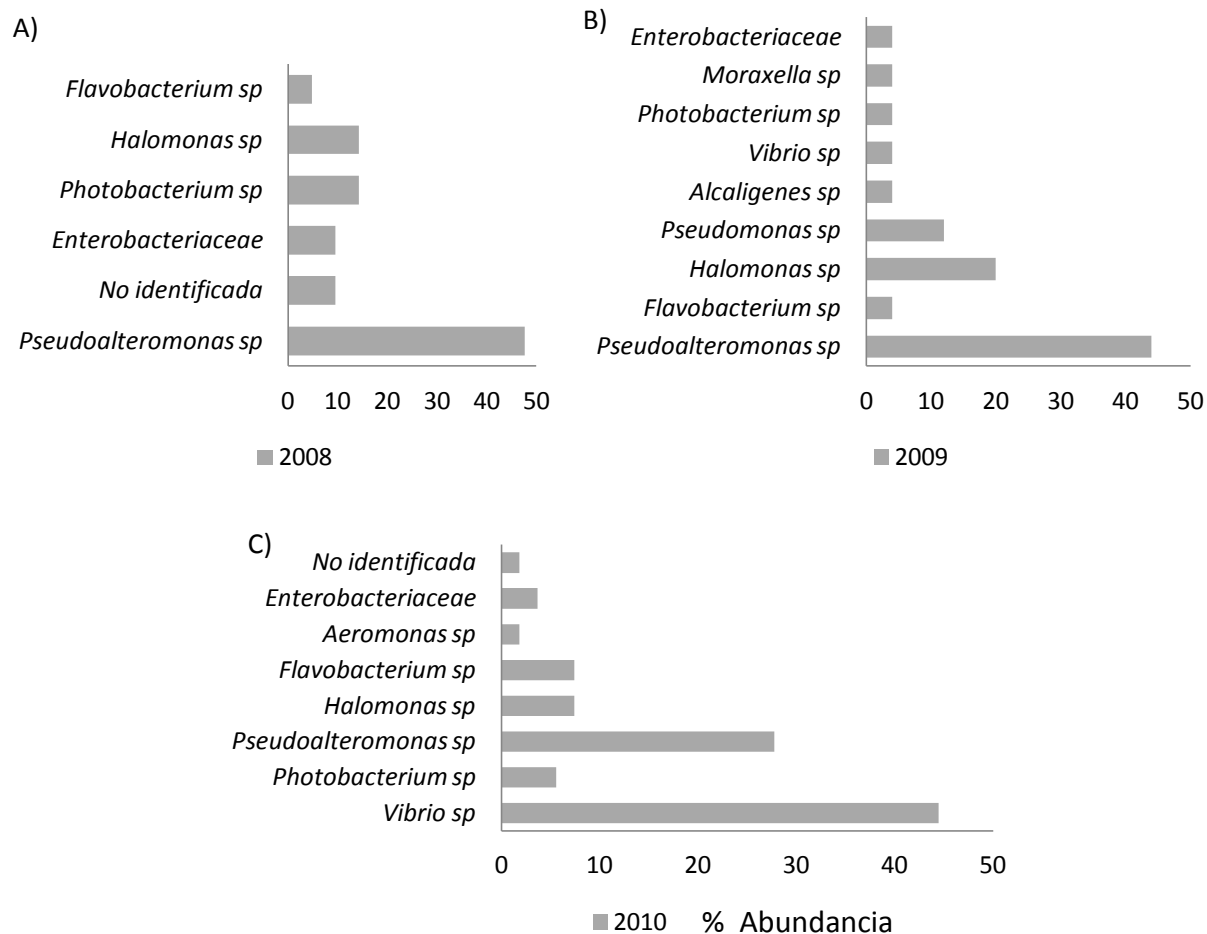


Figura 33. Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de agua de mar en la localidad de Punta Baja durante las temporadas 2008, 2009 y 2010. A) géneros encontrados en noviembre del 2008; B) en abril del 2009; C) en marzo del 2010.

Por último, para las muestras del alga *B. orbigniana*, se encontró que el género más abundante en 2008 y 2009 fue *Pseudoalteromonas* (Fig. 35A y B). En 2008 el segundo género más común fue *Vibrio*, sin embargo en el 2009 no se encontró. Para el 2009, el segundo género más abundante fue *Halomonas* y fue el tercero más común en el 2008. En la temporada del 2008 se encontró una mayor cantidad de géneros, entre los que destacan *Micrococcus* y *Enterococcus* que tuvieron un 5% de abundancia, mientras que en el 2009 el género *Enterobacteriaceae* estuvo por arriba del 10% de abundancia (Fig. 35).

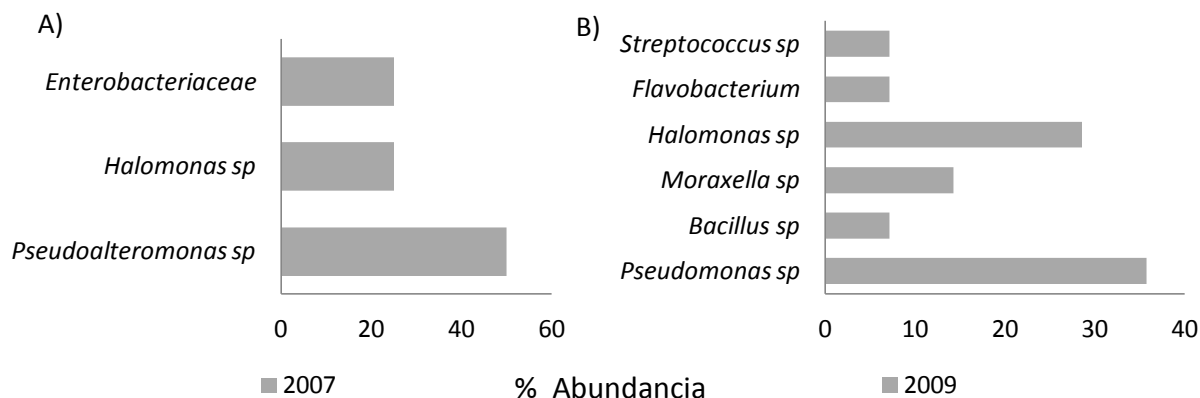


Figura 34. Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de *M. californianus* en la localidad de Punta Baja durante las temporadas 2007 y 2009. A) géneros encontrados e marzo del 2007; B) en abril del 2009.

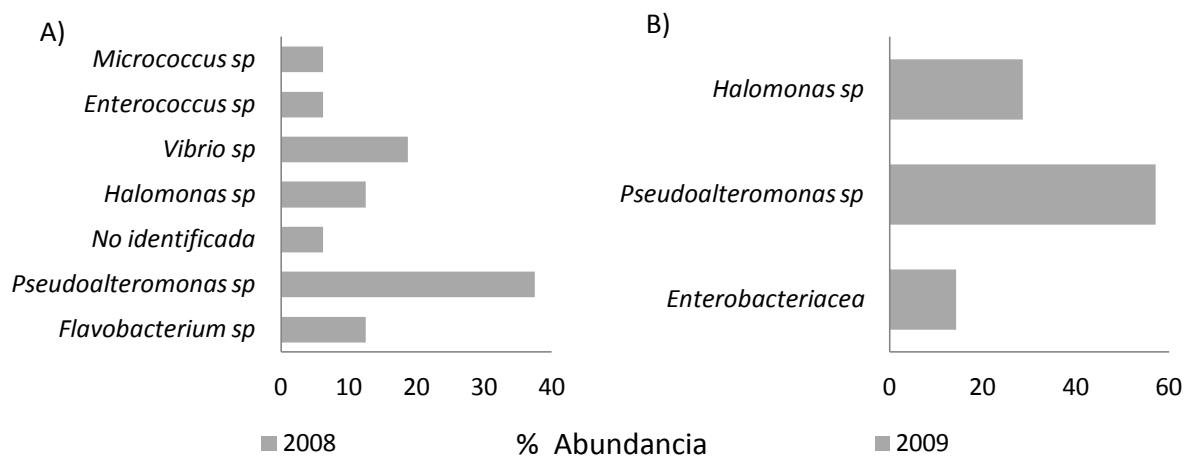


Figura 35. Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de *B. orbigniana* en la localidad de Punta Baja durante las temporadas 2008 y 2009. A) géneros encontrados en noviembre del 2008; B) en abril del 2009.

2.3.7.2 Análisis espacio-temporal para la localidad de Playa Esmeralda

El análisis de diversidad espacial de géneros bacterianos para la localidad de Playa Esmeralda, demostró que para la temporada de noviembre del 2008, la composición de géneros bacterianos varió entre los diferentes sustratos (Fig. 36A). La diversidad de géneros bacterianos de *A. incisa* fue alrededor de 50% similar al de agua de mar, mientras que la composición de géneros del alga *C. vancouverensis* presentó una similitud de alrededor del 30% en relación a los otros sustratos (Fig. 36A). Para la temporada de abril del 2009, se observó que la diversidad de géneros bacterianos entre las algas *C. vancouverensis* y *C. canaliculatus* presentó una similitud del 40% y difirió de las de agua de mar y del erizo negro *A. incisa* (Fig. 36B). Así mismo, se determinó que la composición de géneros del agua de mar fue 50% similar a la de *A. incisa*, la cual se mantuvo durante los muestreos realizados en el 2008 y el 2009 (Fig. 36B).

Por último, para la temporada de marzo del 2010, se observó que la diversidad de géneros bacterianos en *A. incisa* tuvo una similitud de alrededor de 60% con las de agua de mar por tercera temporada consecutiva (Fig. 36C). Además también se observó que la composición de géneros bacterianos con respecto a la del alga *C. vancouverensis* fue del 75% de similitud con respecto a las de agua de mar, algo que en las temporadas anteriores no se observó.

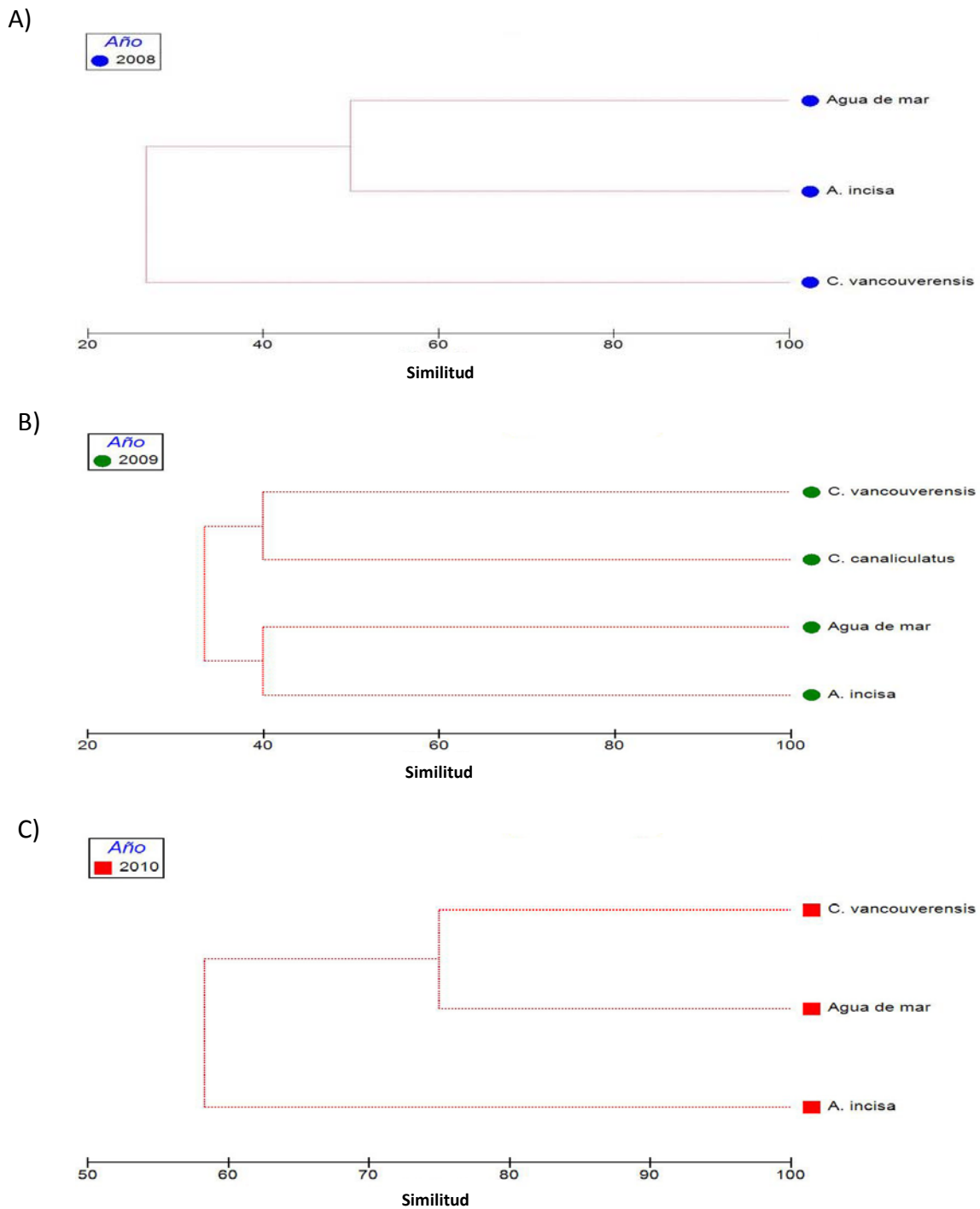


Figura 36. Análisis de la diversidad de géneros bacterianos representados en cladograma mediante el coeficiente de similitud de Jaccard para muestras bacterianas aisladas de la localidad de Playa Esmeralda. A) diversidad en la composición de géneros bacterianos entre los diferentes sustratos para las muestras de noviembre del 2008; B) para abril del 2009 ; C) marzo del 2010. Similitud en porcentajes.

En relación al análisis temporal de la diversidad de géneros bacterianos, se observó que las muestras de agua de mar del 2008 y 2009 presentaron una similitud por arriba del 60%, de igual manera para las muestras de *A. incisa* y *C. canaliculatus*. Las muestras del alga *C. vancouverensis* del 2008 y 2010, fueron similares en un 60% a las de agua de mar del 2010 y de *A. incisa* del 2009. De manera general se puede decir que la diversidad bacteriana en *A. incisa* fue diferente en las tres temporadas, mientras que las muestras de agua de mar y *C. vancouverensis* fueron muy similares en las dos temporadas (Fig. 37).

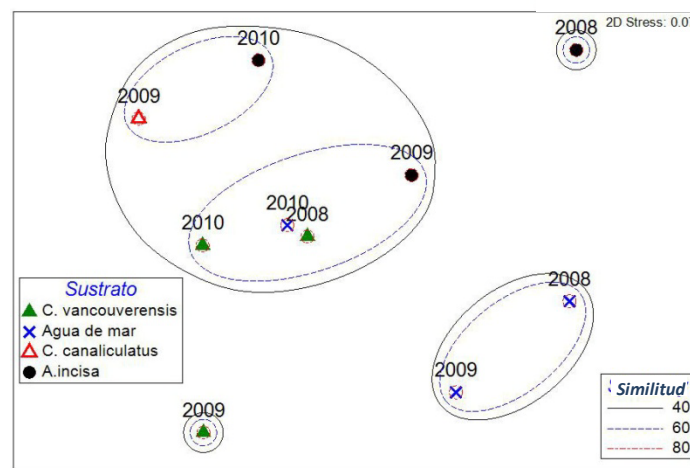


Figura 37. Análisis de la diversidad de géneros bacterianos representada en MDS mediante el coeficiente de similitud de Jaccard para muestras bacterianas aisladas de la localidad de Playa Esmeralda para las temporadas de noviembre del 2008, abril del 2009 y marzo del 2010. Los círculos de similitud está representado en porcentajes.

Al realizar un análisis en la composición y abundancia de géneros bacterianos para cada sustrato, se encontró que para *A. incisa*, el género más abundante en 2008, 2009 y 2010 fue *Vibrio* (Fig. 38). El segundo más abundante fue el género *Halomonas* el cual no se encontró en el 2008. El género *Aeromonas* fue el tercer género más abundante, aunque no fue encontrado en la temporada del 2010 (Fig. 38).

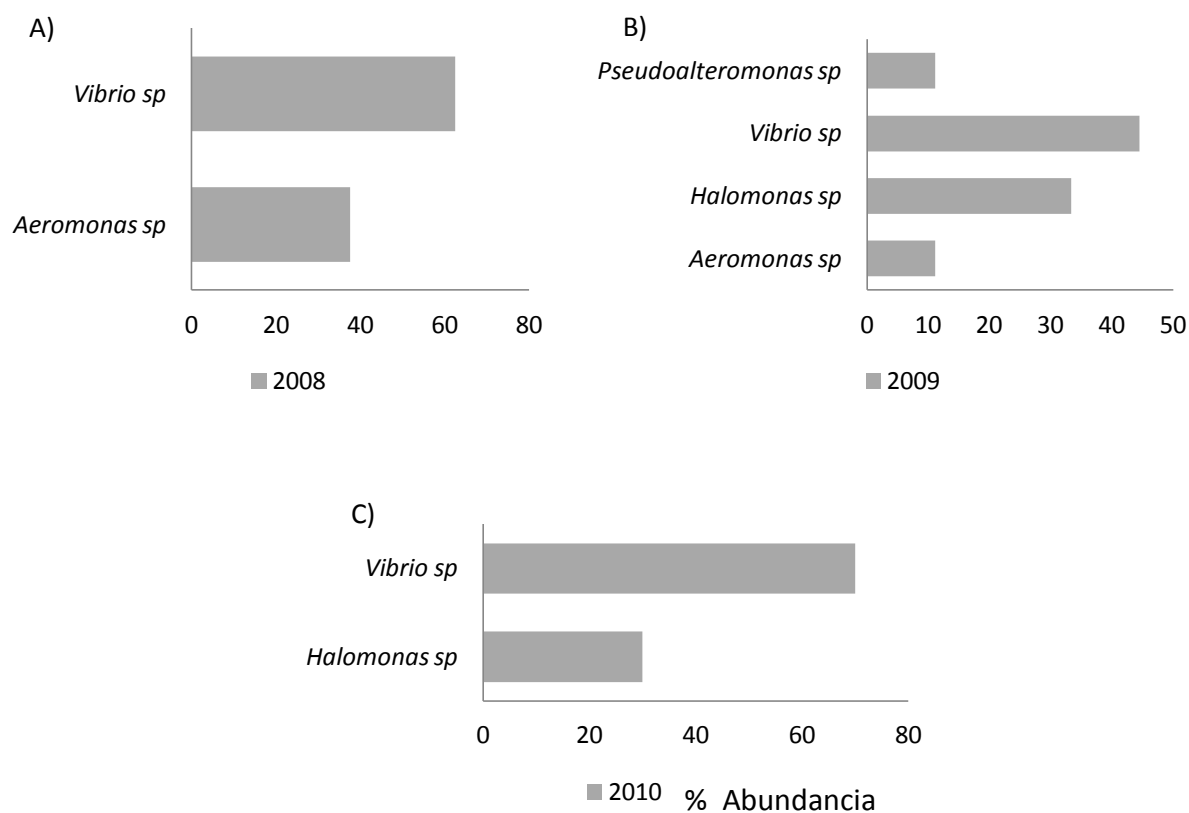


Figura 38. Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de *A. incisa* en la localidad de Playa Esmeralda durante las temporadas 2008, 2009 y 2010. A) géneros encontrados en 2008; B) en el 2009; C en el 2010.

Para el alga coralina *C. vancouverensis* se encontró que el género más abundante, al igual que en *A. incisa* en las tres temporadas, fue *Vibrio* (Fig. 39). Sin embargo se encontró que para el 2008, el segundo más abundante fue *Halomonas*, seguido por *Pseudoalteromonas*. Para el 2009, el género *Flavobacterium*, tuvo el mismo porcentaje de abundancia que *Vibrio*, además se encontró el género *Staphylococcus*, el cual no se había aislado en ninguna localidad (Fig. 39B). Para el 2010, los géneros que le siguieron en abundancia a *Vibrio*, fueron *Pseudoalteromonas* y *Flavobacterium*. También se encontró *Halomonas*, pero estuvo por debajo del 10% de abundancia (Fig. 39C).

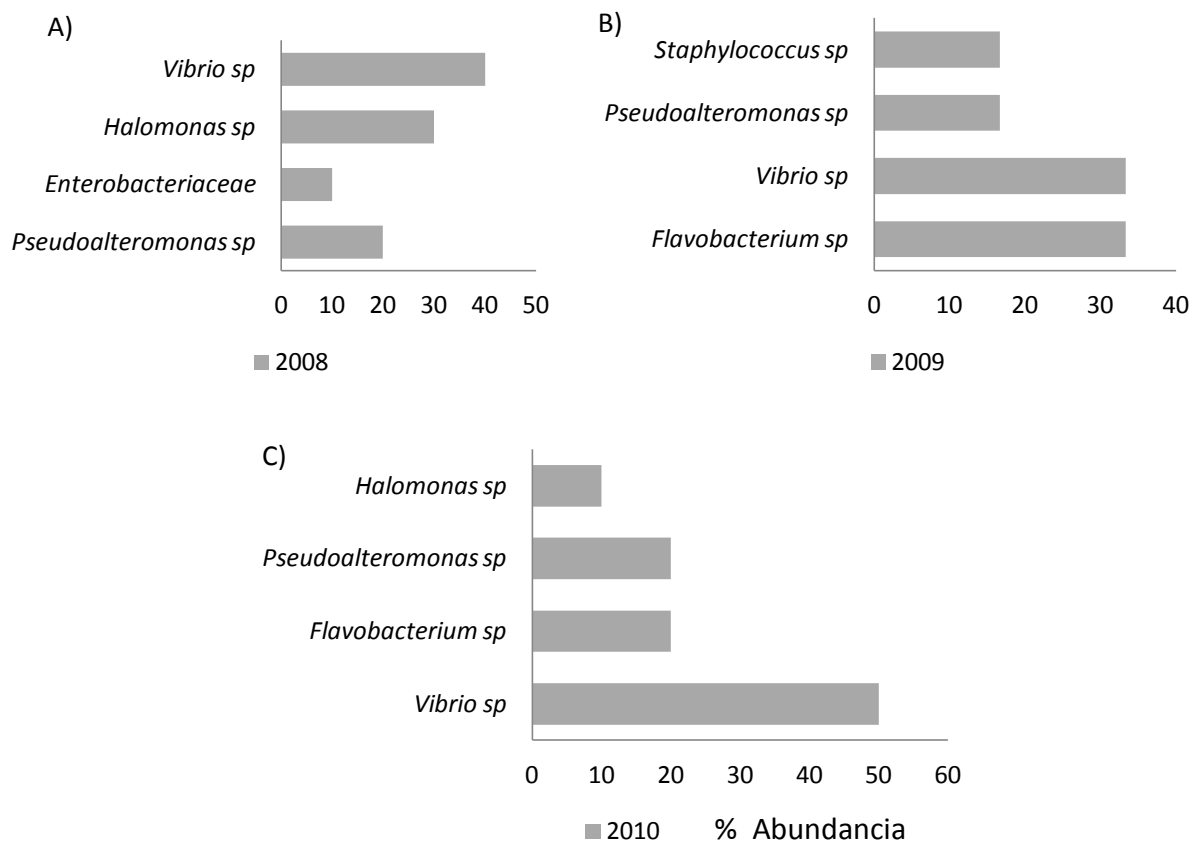


Figura 39. Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de *C. vancouverensis* en la localidad de Playa Esmeralda durante las temporadas 2008, 2009 y 2010. A) géneros encontrados en 2008; B) en el 2009; y C) en 2010.

Para las muestras de agua de mar se encontró que, de igual manera a los sustratos anteriores, el género *Vibrio* fue el más abundante durante las tres temporadas de muestreo (Fig. 40). El género *Photobacterium* fue el segundo más abundante durante los muestreos de 2008 y 2009, pero no se encontró en el 2010, en donde para esta temporada el segundo más abundante fue *Halomonas*, la cual fue la única temporada en donde se encontró (Fig. 40B y C). Uno de los géneros que estuvo presente en las tres temporadas fue *Pseudoalteromonas*, pero con la abundancia más baja (alrededor del 10%). Por último, para el 2008 se encontró el género *Aeromonas* el cual no se volvió a encontrar en las siguientes temporadas (Fig. 40A).

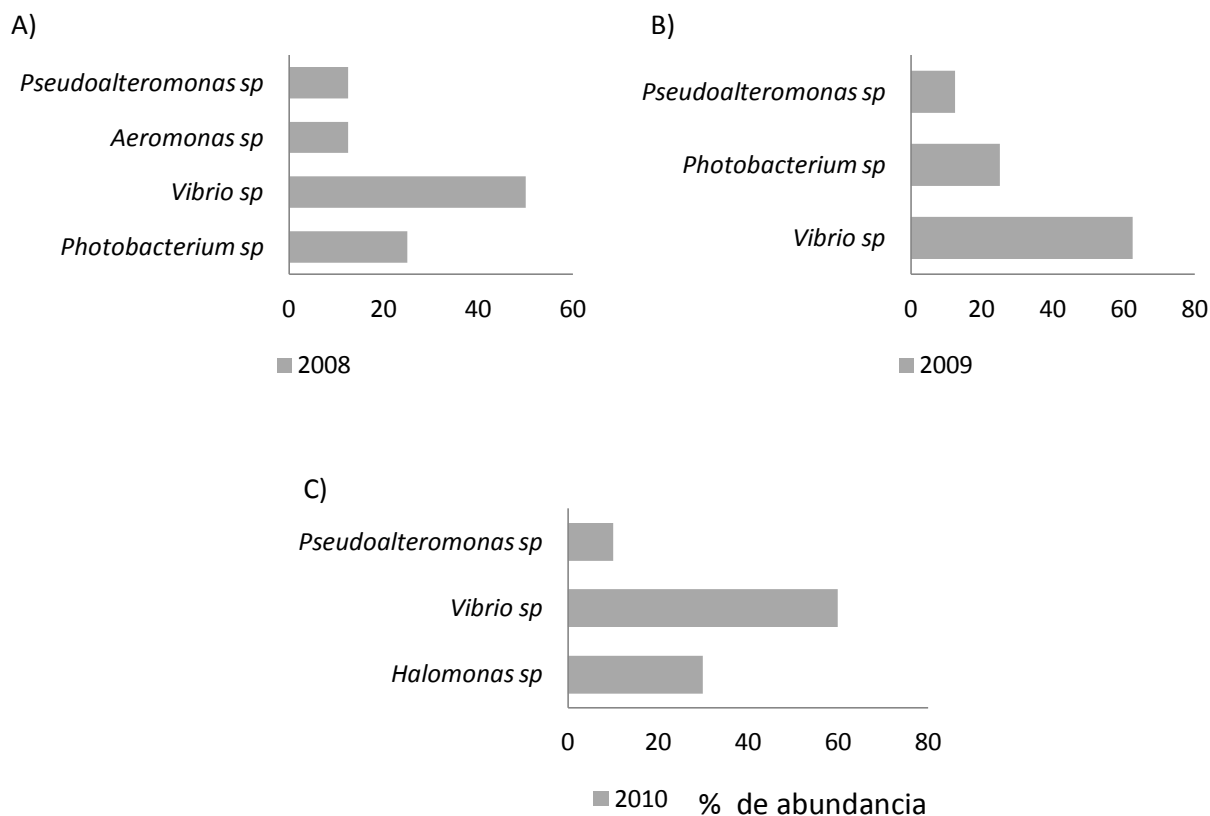


Figura 40. Composición y abundancia de géneros bacterianos aislados de agua de mar en la localidad de Playa Esmeralda durante las temporadas 2008, 2009 y 2010. A) géneros encontrados en el 2008; B) en el 2009; C) en el 2010.

2.3.8 Análisis temporal en la diversidad de géneros bacterianos entre Punta Baja y Playa Esmeralda

Para comparar la diversidad de géneros bacterianos entre temporadas de las dos localidades, primero se realizó un análisis entre las muestras de marzo y diciembre del 2007 de Punta Baja y se compararon con las muestras del 2008, 2009 y 2010 de Playa Esmeralda. Los resultados mostraron una diferencia significativa entre las dos localidades en los diferentes años y sustratos (Fig. 41A y B). Sin embargo las muestras del alga *C. vancouverensis* de Punta Baja en marzo del 2007 y diciembre del 2007, presentaron un 55% de similitud con las muestras aisladas de agua de mar de Playa Esmeralda del 2008 y 2009 (Fig. 41A y B).

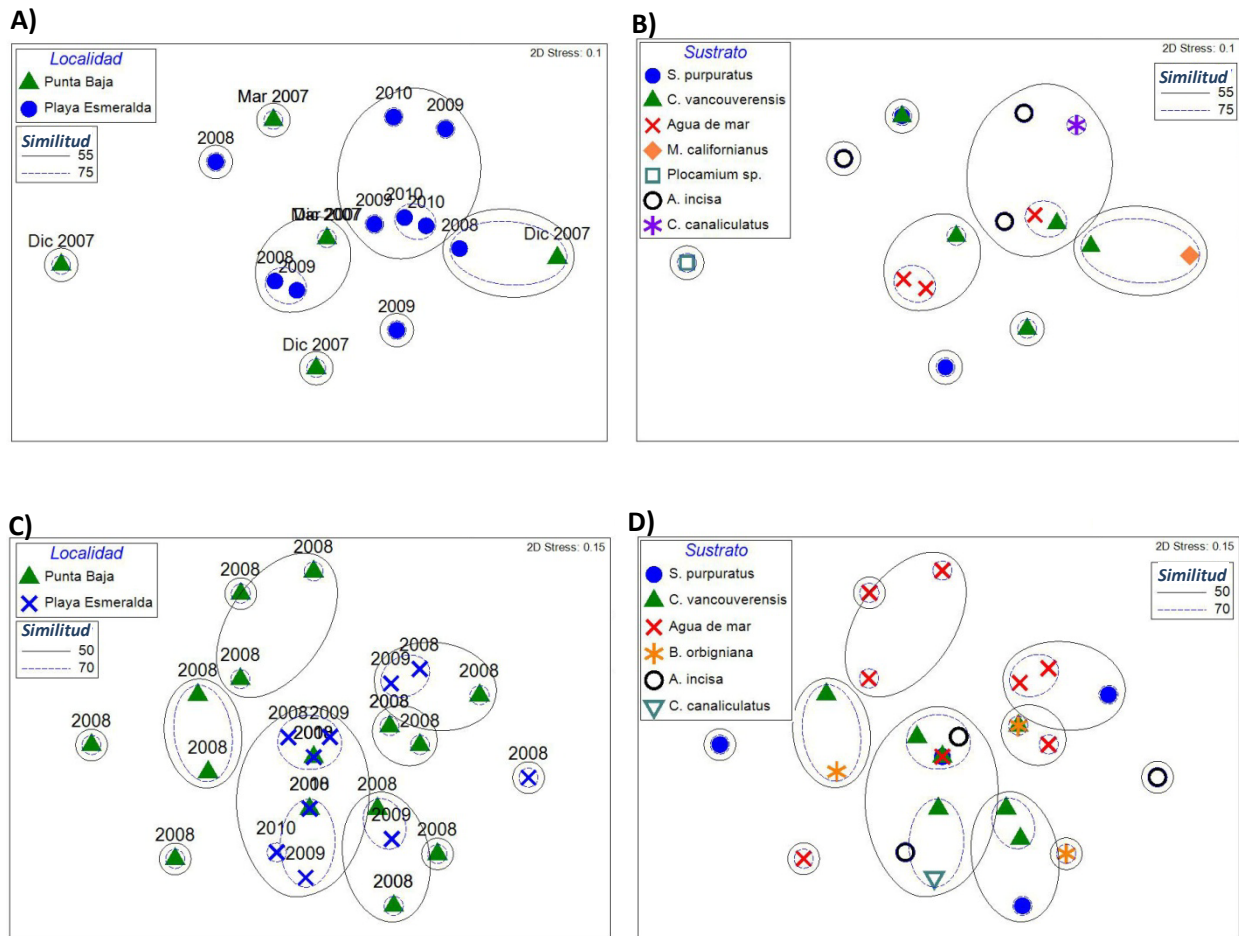


Figura 41. Análisis de la diversidad de géneros bacterianos representados en MDS mediante el coeficiente de similitud de Jaccard para muestras bacterianas aisladas de la localidad de Punta Baja y Playa Esmeralda para las temporadas de marzo y diciembre del 2007, noviembre del 2008, abril del 2009 y marzo del 2010. A y B) análisis de diversidad de géneros bacterianos para las muestras de marzo y diciembre del 2007 en comparación con las muestras de Playa Esmeralda del 2008, 2009 y 2010; C y D) análisis para las muestras de Punta Baja del 2008 en relación a todas las de Playa Esmeralda. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

Los resultados del análisis de diversidad bacteriana entre las muestras de Punta Baja del 2008 con las diferentes temporadas de las muestras de Playa Esmeralda, mostraron que de igual manera a lo observado con las muestras del 2007, existió una diferencia marcada entre la composición de géneros bacterianos entre las localidades de Punta Baja y Playa Esmeralda. Sin embargo, se observó una similitud del 70% entre las muestras aisladas del alga *C. vancouverensis* de Punta Baja durante el 2008 y 2009, con muestras aisladas de agua de mar, *C. vancouverensis* y del erizo *A. incisa* de Playa Esmeralda durante el 2008 y 2009 (Fig. 41C y D).

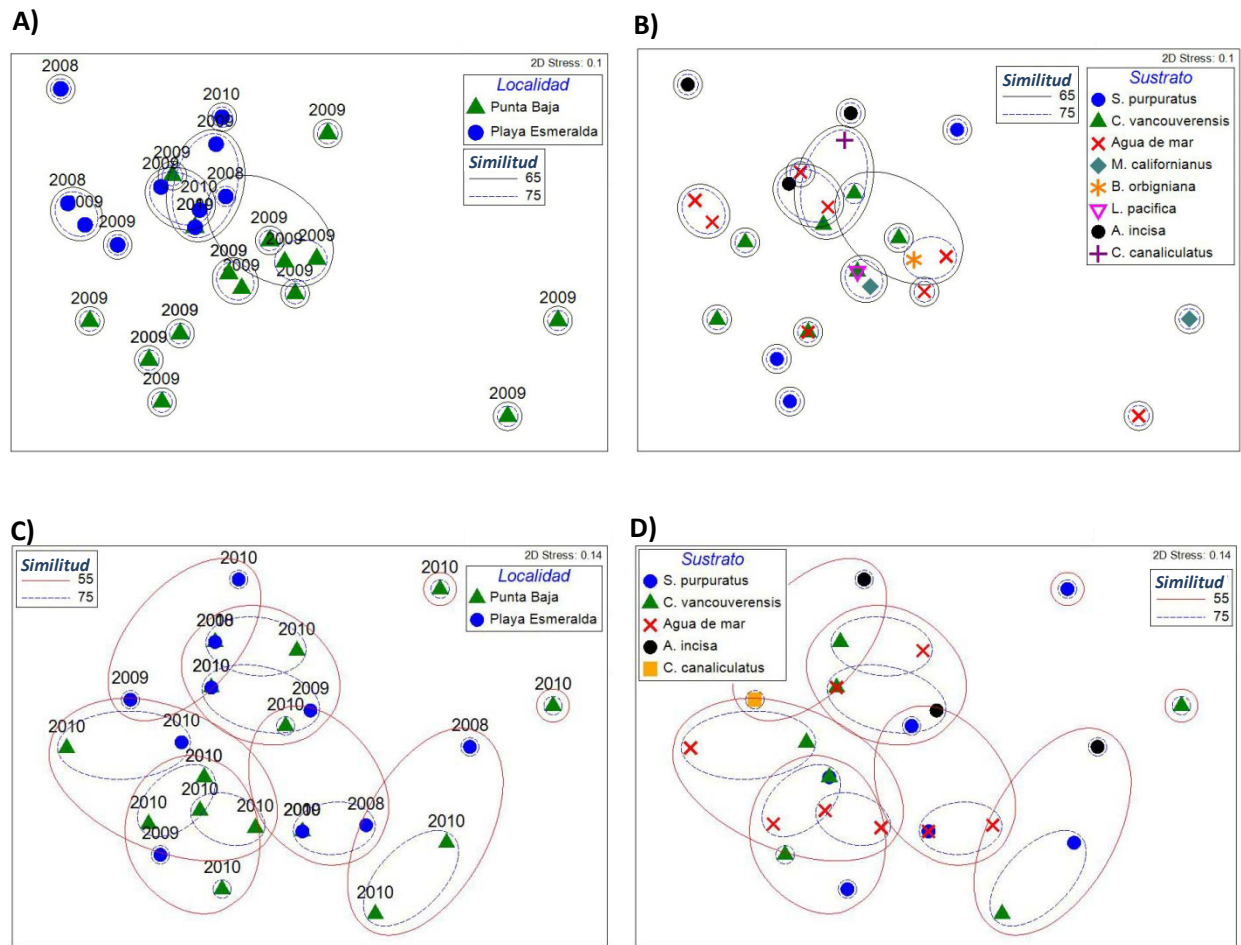


Figura 42. Análisis de la diversidad de géneros bacterianos representado en MDS mediante el coeficiente de similitud de Jaccard para muestras bacterianas aisladas de la localidad de Punta Baja y Playa Esmeralda. A y B) análisis de diversidad de géneros bacterias para las muestras de abril del 2009 en comparación con las muestras de Playa Esmeralda del 2008, 2009 y 2010; C y D) análisis para las muestras de Punta Baja del 2010 en relación a todas las muestras obtenidas de Playa Esmeralda. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

El análisis de diversidad bacteriana de la temporada de abril del 2009 de la localidad de Punta Baja en comparación con las temporadas de noviembre del 2008, abril del 2009 y marzo del 2010 de Playa Esmeralda, mostró una diferencia muy marcada entre la composición de géneros bacterianos entre ambas localidades (Fig. 42A y B). Por último, en el análisis de la localidad de Playa Esmeralda en comparación con la temporada de marzo del 2010 de Punta Baja, se encontró que la mayoría de las muestras de Playa Esmeralda tuvieron una similitud del 60% en la diversidad de géneros bacterianos con las muestras de diferentes sustratos de Punta Baja (Fig. 42C y D).

2.3.9 Análisis espacio-temporal de las características metabólicas bacterianas de Punta Baja

Mediante el análisis de similitud por Clusters por medio del coeficiente de emparejamiento simple, fue posible agrupar a las bacterias en 18 grupos de acuerdo a sus características metabólicas (ver Clusters en apéndice I y tabla 5 en apéndice II).

2.3.9.1 Análisis espacial:

Mediante un análisis general de todas las bacterias aisladas en la temporada del 2008 por el coeficiente de emparejamiento simple en MDS, se encontró que los diferentes sustratos compartieron en gran medida características metabólicas similares, aunque también se observaron bacterias con diferentes condiciones metabólicas aunque en menor proporción (Fig. 26A y B).

Por otro lado, se observó que la variación espacial de estos grupos metabólicos con respecto a las diferentes zonas del intermareal y los transectos fue baja; en general no se observó variación espacial (Fig. 43A y B). Sin embargo, se observaron ciertos grupos metabólicos que tienen una mayor representatividad para cada sustrato en particular. Por otro lado, al realizar un análisis más minucioso para cada sustrato en las diferentes zonas y transectos del intermareal, fue posible observar diferencias en la composición de grupos metabólicos. Las muestras bacterianas de *S. purpuratus* mostraron que estas difieren metabólicamente dependiendo de la zona intermareal de donde se aislaron; sin embargo se observaron pocos grupos bacterianos que comparten similitud entre las diferentes zonas y transectos (Fig. 43C).

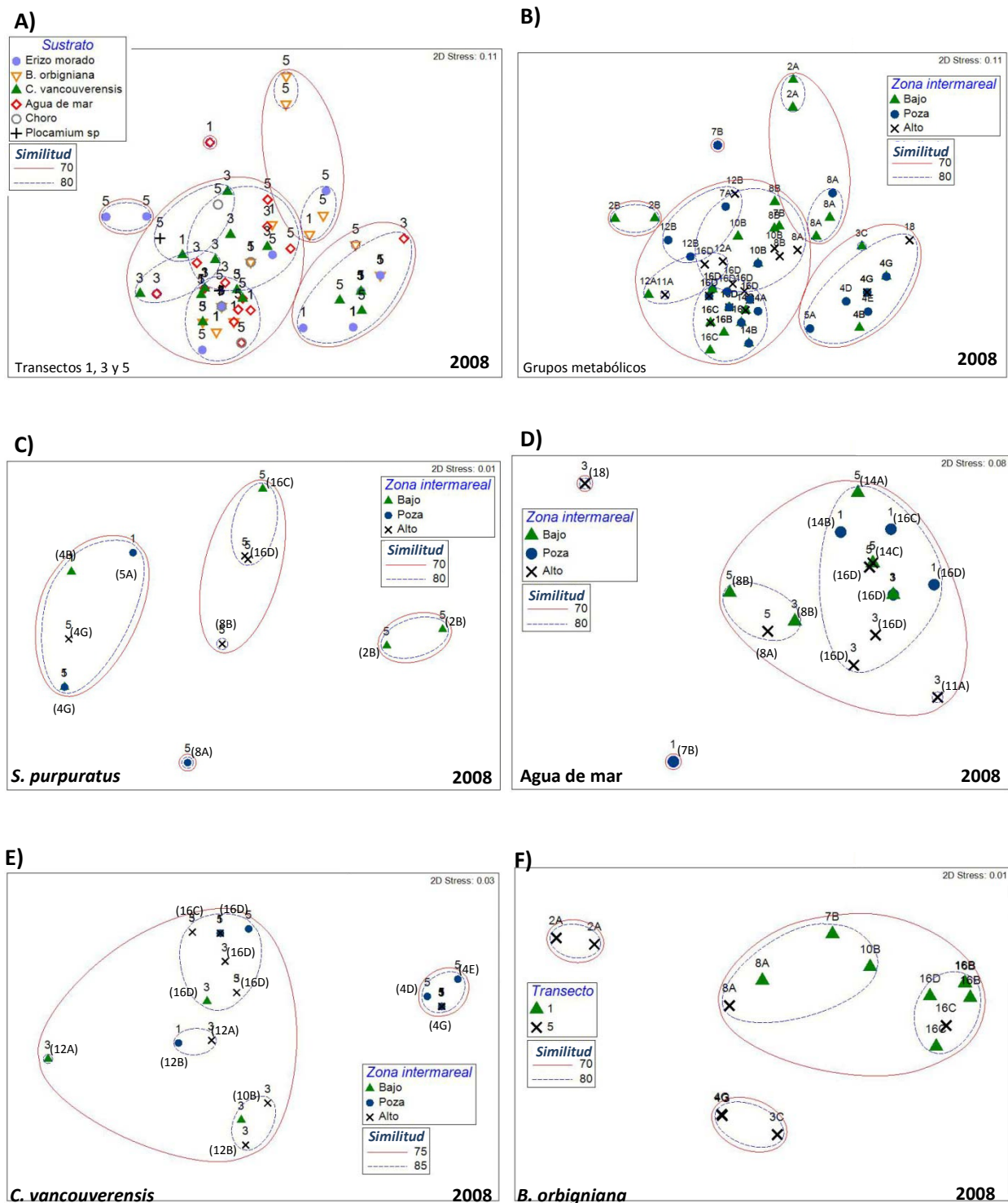


Figura 43. Análisis espacial representados en MDS de las características metabólicas de bacterias aisladas en la localidad de Punta Baja en noviembre del 2008 mediante el coeficiente de emparejamiento simple. A y B) agrupación de todas las bacterias aisladas de los diferentes sustratos en los diferentes transectos en las tres zonas del intermareal. C) bacterias aisladas de erizo morado; D) bacterias aisladas de agua de mar; E) bacterias aisladas de *C. vancouverensis*; F) bacterias aisladas de *B. orbigniana* en la zona baja del intermareal. Los números representan el número de transecto del aislado. Los números con letras representan los grupos metabólicos al que pertenecen. Similitud dado en porcentaje. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

El grupo metabólico más representativo correspondió a las bacterias del grupo 4B, seguido por el grupo 4G (ver características metabólicas en apéndice II). En cuanto a las bacterias aisladas de agua de mar se observó que tienen una similitud metabólica entre el 70 y 80%; sin embargo, no se apreció una diferencia espacial entre zonas del intermareal y los transectos. (Fig. 43D). Así mismo, se encontró que el grupo metabólico más representativo para esta temporada correspondió al grupo metabólico 16D (ver características metabólicas en apéndice II).

Las bacterias aisladas del alga *C. vancouverensis* de la poza de intermareal del transecto 5 resultaron ser metabólicamente diferentes a aquellas de las zonas alto y bajo de los transectos 5 y 3 (Fig. 43E). Las principales características metabólicas de las bacterias de las pozas fue la capacidad de crecer en medio TCBS y MacConkey fermentando la sacarosa y la lactosa, además pudieron crecer en salinidades de 6%. Bacterias de la zona baja y alta, no crecieron en medio TCBS ni en MacConkey pero pueden crecer en condiciones hipersalinas (Fig. 43E).

Por otro lado, los grupos metabólicos más representativos para esta temporada correspondieron a los del grupo 4G y 16D (ver características metabólicas en apéndice II). En cuanto al alga coralina *Bosiella orbigniana*, solamente se aislaron bacterias de la zona baja del intermareal para los transectos 1 y 5, los cuales en su mayoría presentaron diferencias metabólicas para ambos transectos. (Fig. 43F). El grupo metabólico más representativo para esta temporada fue el 16B (ver características metabólicas en apéndice II).

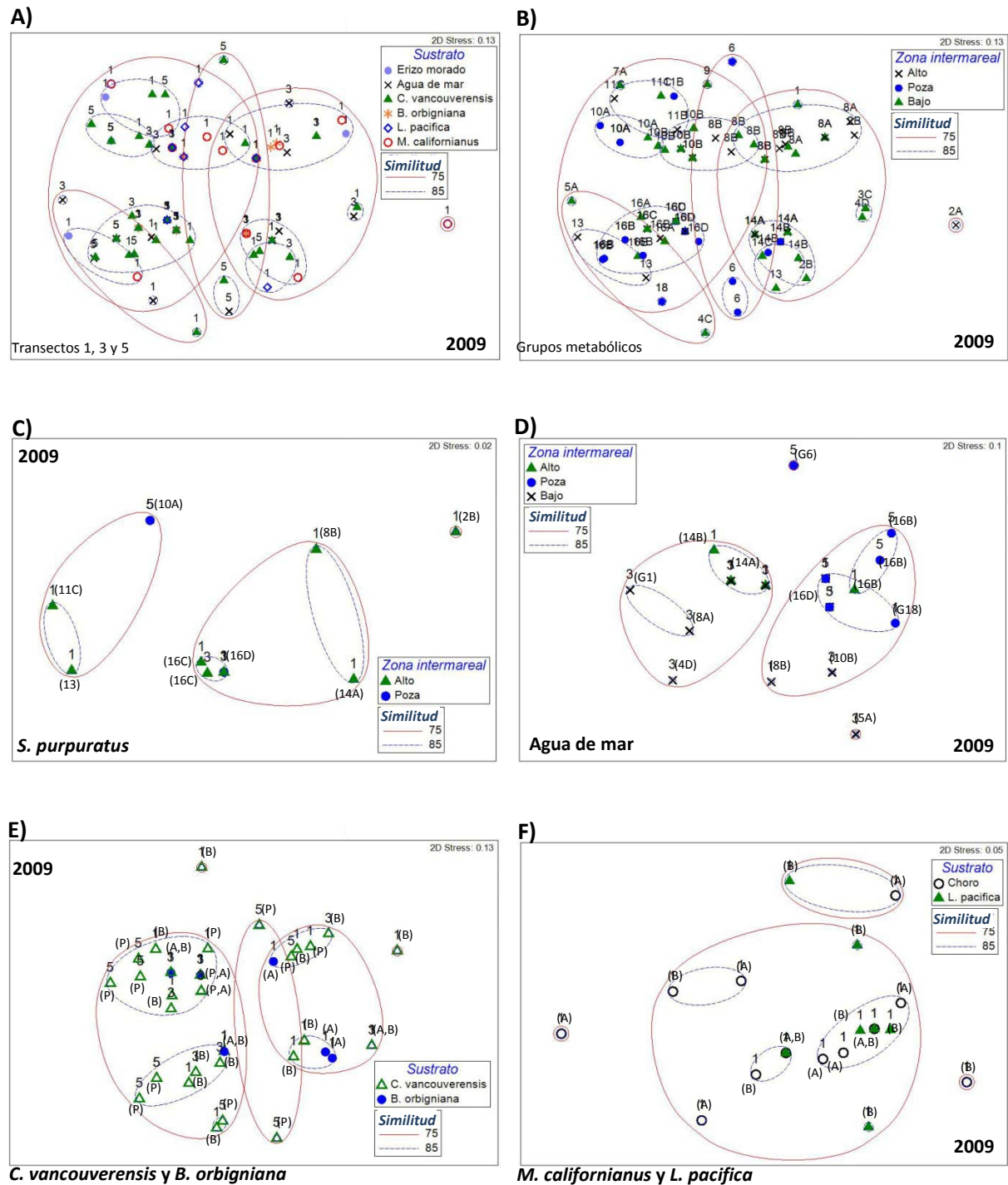


Figura 44. Análisis espacial de MDS de las características metabólicas de bacterias aisladas en la localidad de punta Baja en abril del 2009 mediante el coeficiente de emparejamiento simple. A) agrupación de todas las bacterias aisladas de los diferentes sustratos en los diferentes transectos, B) en las tres zonas del intermareal. C) bacterias aisladas de erizo morado; D) bacterias aisladas de agua de mar; E) bacterias aisladas de *C. vancouverensis* y *B. orbigniana*; F) bacterias aisladas de *M. californianus* y *L. pacifica*. Los números sin letra representan el número del transecto. Los números con letra y en paréntesis representan los grupos metabólicos al que pertenecen. Las letras en paréntesis representan la zona de intermareal (A) alto, (B) bajo y (P) poza. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

Para la temporada del 2009, se observó una gran diferencia en el metabolismo de las bacterias aisladas de un solo sustrato, así como entre los diferentes sustratos, aunque también cabe mencionar que se observó que ciertos grupos bacterianos de varios sustratos fueron muy similares entre sí (75 -85%) (Fig. 44A y B). Por otro lado, se observó que existe una mayor similitud entre las bacterias aisladas de la zona baja y alta del intermareal de los transectos 1 y 3, a diferencia de las bacterias aisladas de la poza de intermareal del transecto 5 (Fig. 44A y B). Así mismo también se observó una similitud (aunque en menor proporción) en las características metabólicas entre bacterias aisladas de la zona baja con relación a las aisladas de las pozas de intermareal (Fig. 44B).

El análisis para cada uno de los sustratos por separado, mostró que hay diferencias metabólicas para bacterias aisladas de erizo morado, entre la zona alta y la poza del intermareal, así como una diferencia del transecto 1 con relación al transecto 3 (Fig. 44C). Los grupos metabólicos más representativos para esta temporada fueron el grupo 10A y 16D (ver características metabólicas en apéndice II). En cuanto a las bacterias aisladas de agua de mar, se observó que las aisladas de las pozas de intermareal se agruparon entre ellas y por lo tanto, difirieron de las aisladas de la zona alta y la zona baja (Fig. 44D). Por otro lado, el grupo metabólico más representativo para esta temporada correspondió al 14A (ver características metabólicas en apéndice II).

Bacterias aisladas del alga *C. vancouverensis* y *B. orbigniana*, se separaron en varios grupos metabólicos, pero no se observó una diferencia entre ambos sustratos, ni tampoco entre la zona del intermareal ni entre los transectos (Fig. 44E). Los grupos metabólicos más representativos para *C. vancouverensis* fueron el 10A y 16B, seguido por el 16C y 16D; para el alga *B. orbigniana* fueron el 8B y el 16D (ver características metabólicas en apéndice II). En relación a las bacterias aisladas de *M. californianus* y el alga *L. pacifica* se observó una segregación de bacterias de diferentes grupos metabólicos, los cuales la mayoría tuvieron una similitud del 75% y no se apreció una diferencia en cuanto a la zona del intermareal (Fig. 44F).

En el análisis de todas las bacterias aisladas en la temporada del 2010, se observó que existieron diferencias metabólicas para cada uno de los sustratos en particular. Sin embargo, un gran número de bacterias aisladas de diferentes sustratos presentaron una similitud entre sí (75 y 85%) (Fig. 45A y B). Así mismo, la composición de grupos metabólicos entre los diferentes sustratos en cada zona y transecto del intermareal no difirieron mucho; sin embargo se observó que ciertos grupos metabólicos específicos fueron más representativos para cada sustrato en particular (Fig. 45A y B). El Análisis por separado de cada uno de los sustratos, mostró que para las bacterias aisladas de erizo morado existió una diferencia metabólica entre las distintas zonas del intermareal, así mismo las bacterias de la zona baja fueron diferentes para cada transecto (Fig. 45C). Por otro lado, las bacterias de la zona alta mostraron una similitud del 85% entre ellas sin importar el transecto, además presentaron una mayor similitud con aquellas de la zona baja, a diferencia de las aisladas de las pozas de intermareal (Fig. 45C). El grupo metabólico más representativo fue el 4A, y en menor magnitud el 3B, 4B, 4E y 8A (ver características metabólicas en apéndice II).

Las bacterias aisladas de agua de mar fueron separadas en varios grupos metabólicos, donde se encontraron bacterias con metabolismos muy diferentes en las distintas zonas del intermareal así como en los transectos; sin embargo dentro de cada agrupación hubo bacterias de diferentes zonas y transectos que tuvieron una similitud del 80% (Fig. 45D). El grupo metabólico más representativo fue el 16D, seguido por el 3C y 16C (ver características metabólicas en apéndice II). Por último, para las bacterias aisladas del alga *C. vancouverensis*, se encontró una diferencia metabólica entre las aisladas de la zona baja con respecto a las de la zona alta (Fig.45E). Por otro lado, se encontró que las bacterias de la zona baja tenían una similitud entre el 70 y 80% en los diferentes transectos; sin embargo el transecto 3 mostró una mayor diferencia en relación al 1 y 5 (Fig.45E). El grupo metabólico más representativo fue el 16A, seguido por el 4A, 4F y 16C (ver características metabólicas en apéndice II).

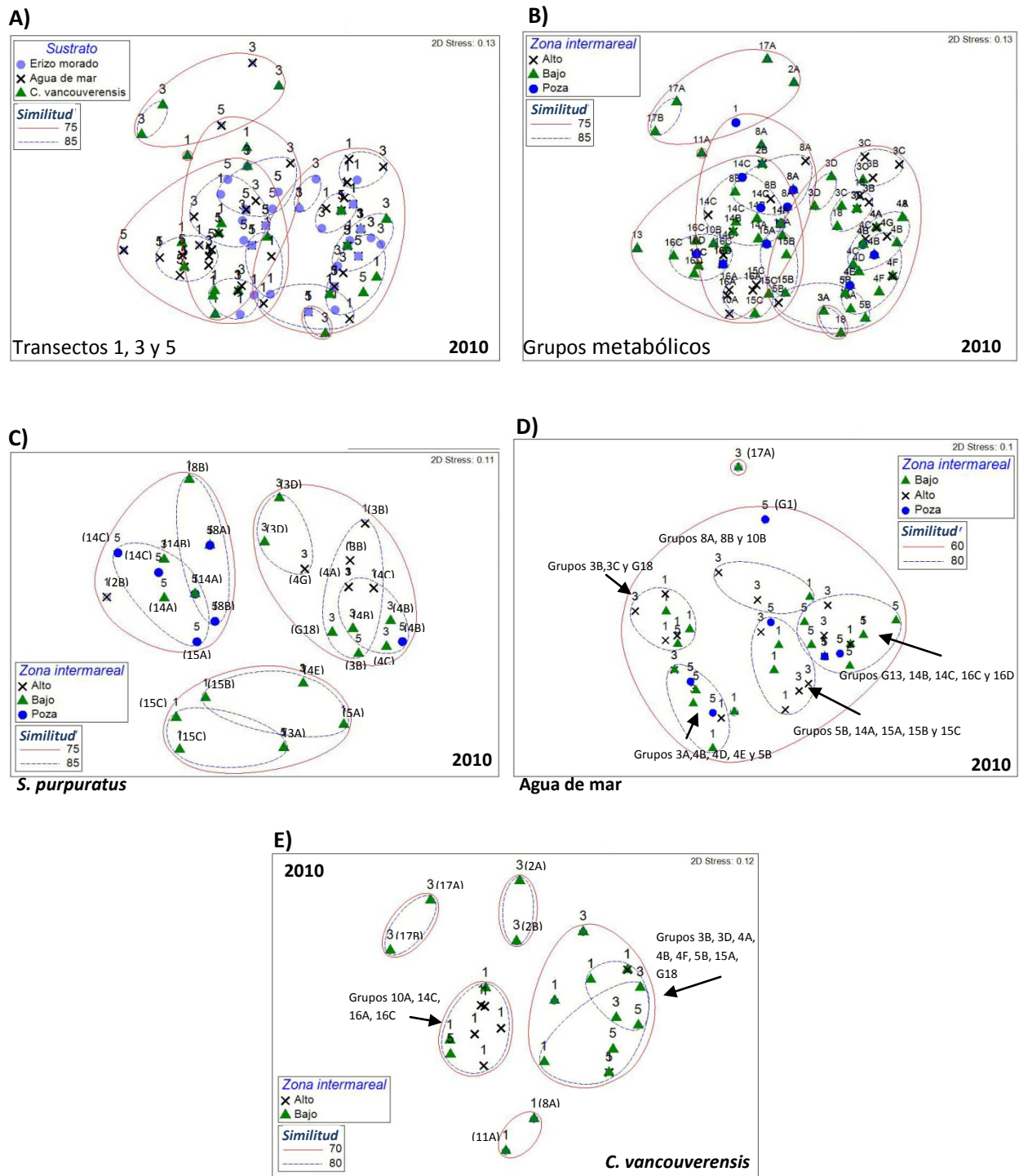


Figura 45. Análisis espacial representado en MDS, de las características metabólicas de bacterias aisladas en la localidad de punta Baja en marzo del 2010 mediante el coeficiente de emparejamiento simple. A) agrupación de todas las bacterias aisladas de los diferentes sustratos en los diferentes transectos, B) en las tres zonas del intermareal. C) bacterias aisladas de erizo morado; D) bacterias aisladas de agua de mar; E) bacterias aisladas de *C. vancouverensis* y *B. orbigniana*. Los números sin letra representan el transecto. Los números con letras y en paréntesis representan los grupos metabólicos al que pertenecen. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

2.3.9.2 Análisis temporal

El análisis temporal se realizó por separado para cada sustrato debido a que un análisis con la totalidad de las muestras bacterianas haría imposible su interpretación. De acuerdo al análisis de las muestras aisladas de erizo morado, se encontró una diferencia en las características metabólicas entre los diferentes años, siendo más similares las bacterias aisladas en 2008 y 2010 en comparación con las del 2009 (Fig. 46A). El número de grupos metabólicos encontrados en el 2008 y 2009 fueron ocho, siendo en 2008 los grupos metabólicos más representativos el 4B y 4G, mientras que en el 2009, fueron el 10A y el 16D. Además, solamente la mitad de los grupos metabólicos encontrados en el 2008 permanecieron para el 2009. Para el 2010, el número de grupos metabólicos encontrados fue el doble a lo obtenido en el 2008 y 2009, siendo alrededor de 19 grupos. De estos, el 75% de los grupos metabólicos encontrados en el 2008 se encontraron en el 2010 y el 35.7% de los grupos metabólicos encontrados en el 2009 fueron encontrados en el 2010. Por otro lado, se observó que las bacterias aisladas de las zonas altas y bajas del intermareal presentaron una mayor similitud que aquellas aisladas de las pozas de intermareal (Fig. 46B). Por otro lado, también se determinó que las características metabólicas difirieron en los distintos transectos. Los transectos 1 y 3 presentaron una mayor similitud entre si y las muestras del transecto 5 fueron significativamente diferentes con el resto de los transectos en 2009 (Fig. 46A).

En relación a las bacterias aisladas de agua de mar, se encontró que el número de grupos metabólicos en el 2008 y 2009 fue entre 10 y 13 grupos, en donde la mayoría de los grupos presentes en 2008 se encontraron en 2009. Así mismo, el grupo metabólico más representativo en 2008 fue el 16D, mientras que en el 2009 fueron el 14A, 16B y 16D. Para la temporada del 2010 se encontraron 24 grupos metabólicos diferentes, siendo los grupos 16D, 3C y 16C los más representativos. La mayoría de los grupos metabólicos del 2008 y 2009 se encontraron en 2010, principalmente el grupo 16D el cual fue uno de los más representativos en las tres temporadas.

Los grupos metabólicos fueron muy similares en las diferentes zonas del intermareal y en los transectos (Fig. 46C y D). Sin embargo, bacterias aisladas durante el 2010 formaron un grupo aparte, el cual presentó características metabólicas diferentes al resto de las bacterias. Estas fueron aisladas principalmente del transecto 1 en la zona baja del intermareal (Fig. 46C y D). En las bacterias aisladas del alga *C. vancouverensis* para la temporada del 2008, se reconocieron ocho grupos metabólicos, para el 2009 15 grupos y para el 2010 también 15 grupos. Los grupos metabólicos fueron en su mayoría diferentes durante los tres años de muestreo, en donde aquellas del 2008 presentaron una mayor similitud con las del 2010 (Fig. 46E y F). Por otro lado, también se observaron grupos metabólicos representativos para cada temporada. En 2008 el grupo metabólico más representativo fue el 4G, seguido por el 16D; para el 2009 fueron el 10A y 16B, seguidos por el 16C y 16D; para el 2010 fue el 16A, seguido por el 4A. En general durante las tres temporadas los grupos metabólicos que dominaron fueron el 16D, 16C y 4G.

Las bacterias aisladas del alga *B. orbigniana* en general fueron muy similares entre los diferentes años, así como en las distintas zonas del intermareal y en los transectos. En el 2008 se identificaron nueve grupos metabólicos, mientras que el 2009 solamente cinco grupos. En el 2008 el grupo metabólico más representativo fue el 16B, a diferencia del 2009 que fue el 8B y 16D. La mayoría de los grupos metabólicos encontrados en 2008 se identificaron también en el 2009. En el 2008 en el transecto 5 en la zona baja del intermareal, se aisló un grupo pequeño de bacterias, las cuales fueron metabólicamente diferentes al resto de los grupos en general (Fig. 47A y B).

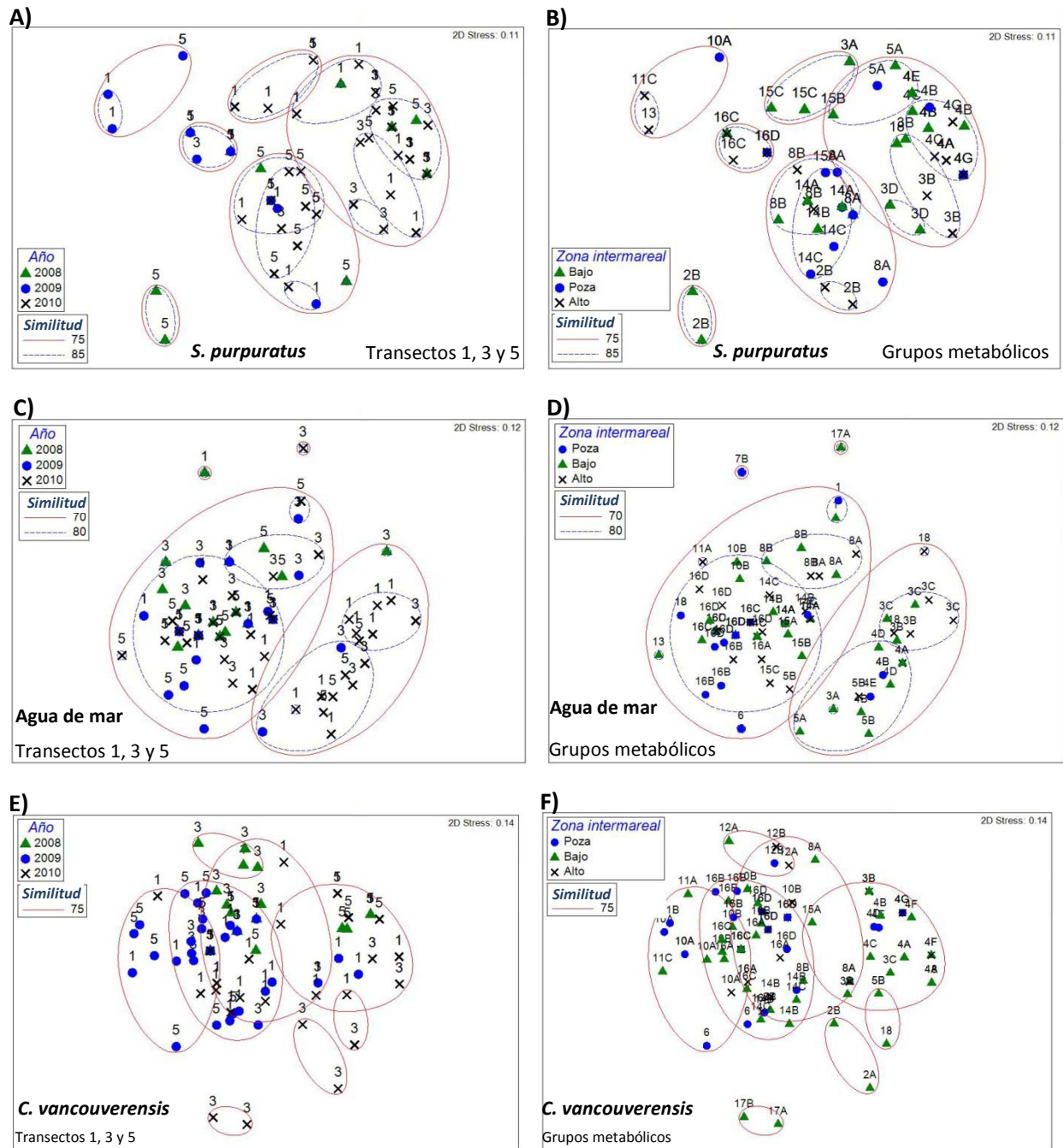


Figura 46. Análisis temporal MDS mediante el coeficiente de emparejamiento simple para muestras bacterianas aisladas en el 2008, 2009 y 2010. Bacterias de erizo morado en los diferentes años y transectos (A) y en las distintas zonas del intermareal y grupos metabólicos (B); bacterias aisladas de agua de mar en los distintos años y transectos (C) y en las distintas zonas del intermareal y grupos metabólicos (D); bacterias aisladas del alga *C. vancouverensis* en los distintos años y transectos (E) y en las distintas zonas del intermareal y grupos metabólicos (F). Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

Por último, los grupos metabólicos encontrados en *M. californianus* para las temporadas del 2007 y 2009 fueron diferentes en cuanto a su composición. En 2007 se identificaron alrededor de cuatro grupos metabólicos, mientras que en el 2009 se encontraron nueve grupos; en donde solamente dos grupos encontrados en 2007 se identificaron en 2009. Por otro lado, las bacterias aisladas de la zona alta del intermareal difirieron metabólicamente de aquellas aisladas de las pozas y de la zona baja (Fig. 47B).

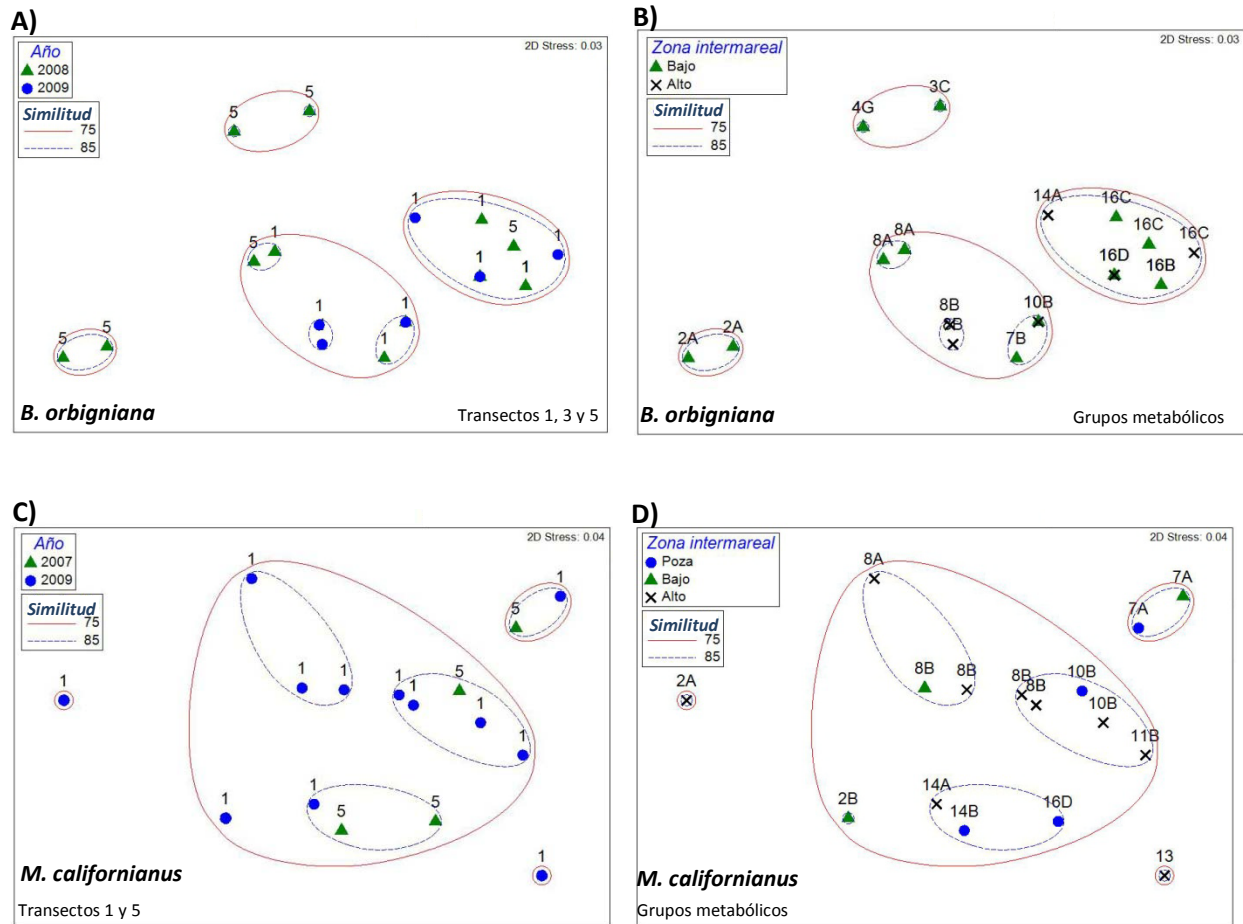


Figura 47. Análisis temporal MDS mediante el coeficiente de emparejamiento simple para muestras bacterianas aisladas en el 2007, 2008 y 2010. Bacterias aisladas del alga *B. orbigniana* en los diferentes años y transectos (A) y en las distintas zonas del intermareal y grupos metabólicos (B); bacterias aisladas *M. californianus* en los distintos años y transectos (C) y en las distintas zonas del intermareal y grupos metabólicos (D). Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

2.3.10 Análisis espacio-temporal de las características metabólicas bacterianas de Playa Esmeralda

Mediante el análisis de emparejamiento de las pruebas bioquímicas y el clúster realizado de todas las cepas bacterianas de esta localidad, fue posible separar las bacterias en 10 grupos de acuerdo a sus características metabólicas (ver Clúster en apéndice I y tabla 5 en apéndice II).

2.3.10.1 Análisis espacial

El análisis de las muestras tomadas en noviembre del 2008, mostró que las bacterias aisladas de erizo negro (*A. incisa*), agua de mar y *C. vancouverensis* compartieron bacterias con las mismas características metabólicas. Sin embargo, se observó que las bacterias de cada sustrato tendieron a agruparse entre ellas mismas, reflejando una diferencia metabólica bacteriana para cada uno de los sustratos (Fig. 48A). Para *A. incisa* el grupo metabólico más representativo fue el 3A, mientras que para agua de mar fueron los grupos 1 y 4D, y por último para *C. vancouverensis* fue el grupo 9.

En relación a las muestras tomadas en abril del 2009, las bacterias aisladas de un solo sustrato variaron metabólicamente entre sí. Las bacterias del alga *C. vancouverensis* además de variar entre sí, presentaron grupos metabólicos diferentes al resto de los sustratos, en donde el grupo metabólico más representativo fue el 4B. Las bacterias de agua de mar y *A. incisa*, presentaron una mayor similitud entre ellas que con el resto de los sustratos, esto se debe a que todos los grupos metabólicos encontrados en agua de mar, también se identificaron en *A. incisa*. Las bacterias del erizo negro (*A. incisa*) presentaron similitud con bacterias aisladas del alga *C. canaliculatus* (Fig. 48B).

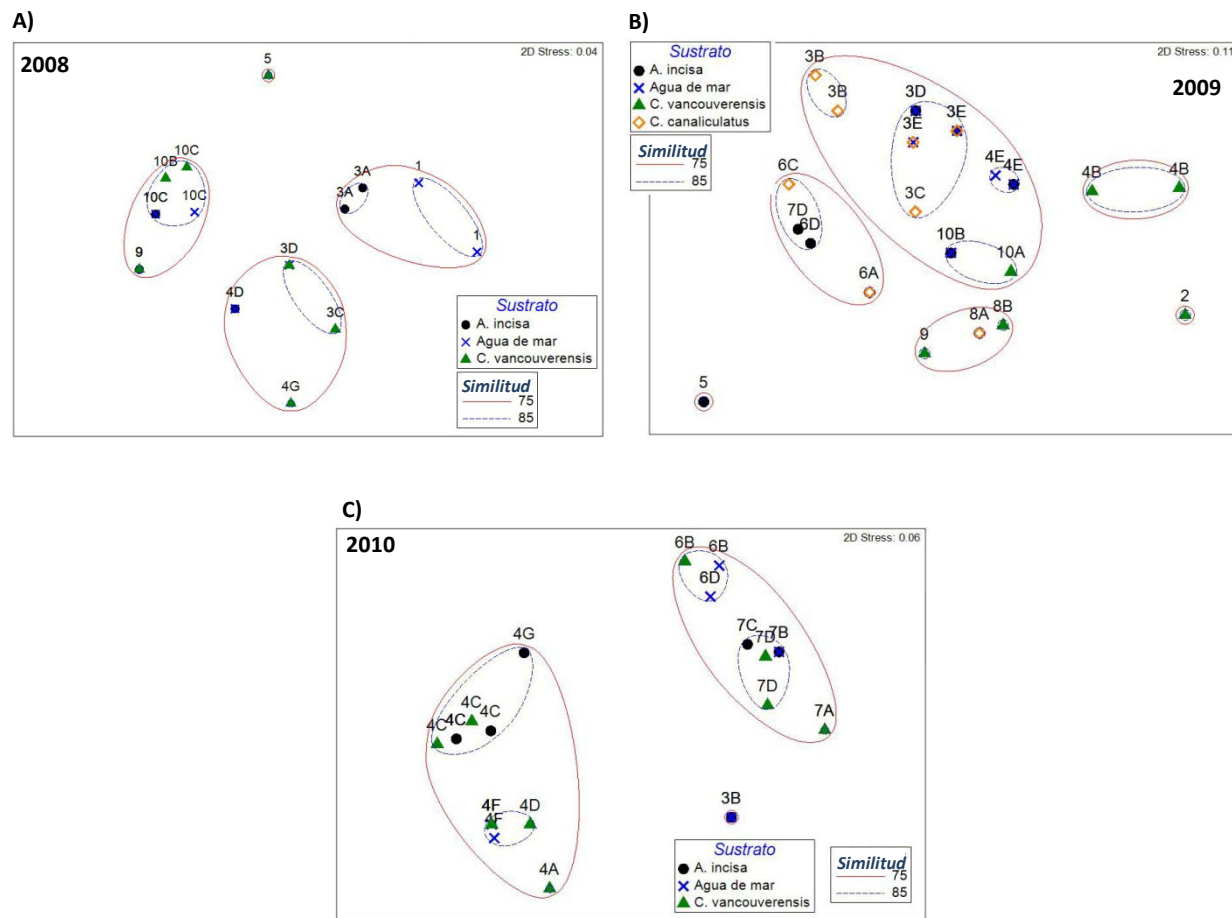


Figura 48. Análisis temporal representado en MDS mediante el coeficiente de emparejamiento simple para muestras bacterianas aisladas en Playa Esmeralda de erizo negro (*A. incisa*), agua de mar y *C. vancouverensis*. A) bacterias aisladas en la temporada 2008; B) en la temporada 2009; C) en la temporada 2010. Las muestras solo se aislaron en la zona baja del intermareal en un solo transecto. Los números en las gráficas representan los grupos metabólicos a los que pertenecieron las cepas. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

En las muestras de marzo del 2010 se observó que cada sustrato difirió en cuanto a su composición de grupos metabólicos, sin embargo los diferentes sustratos compartieron ciertas bacterias que fueron metabólicamente similares, en porcentajes entre un 75 y 85% (Fig.48C). El grupo metabólico representativo de *A. incisa* fue el 4C, para agua de mar fue el 4F y para *C. vancouverensis* fueron el 4F y el 7D. De esta manera, el grupo metabólico más representativo de los tres sustratos fue el grupo 4 (ver características metabólicas en apéndice II) (Fig. 48C).

2.3.10.2 Análisis temporal

De igual manera a lo realizado para la localidad de Punta Baja, el análisis se llevó a cabo para cada uno de los sustratos por separado. Para las muestras aisladas de erizo negro (*A. incisa*), se observó que las características metabólicas difirieron para cada uno de los años de muestreo (Fig.49A). Esto significa que los grupos metabólicos encontrados en cada temporada no se volvieron a presentar en las otras temporadas. Al igual que en el erizo negro, los grupos metabólicos de bacterias aisladas de agua de mar, fueron diferentes entre las temporadas de muestreo (Fig. 49B). Solamente el grupo 3D se observó en 2008 y 2009.

Para las bacterias aisladas del alga *C. vancouverensis*, se observó que las cepas aisladas de un mismo año difirieron considerablemente en sus características metabólicas y también difirieron por temporadas de muestreo, en donde bacterias aisladas en un mismo año tendieron a agruparse entre sí, lo cual fue claramente visible para las muestras del 2009 y 2010 (Fig.49C). En general se puede decir que los grupos metabólicos identificados durante los diferentes años, fueron exclusivos para cada temporada. Solamente el grupo metabólico 9 fue identificado en el 2008 y 2009.

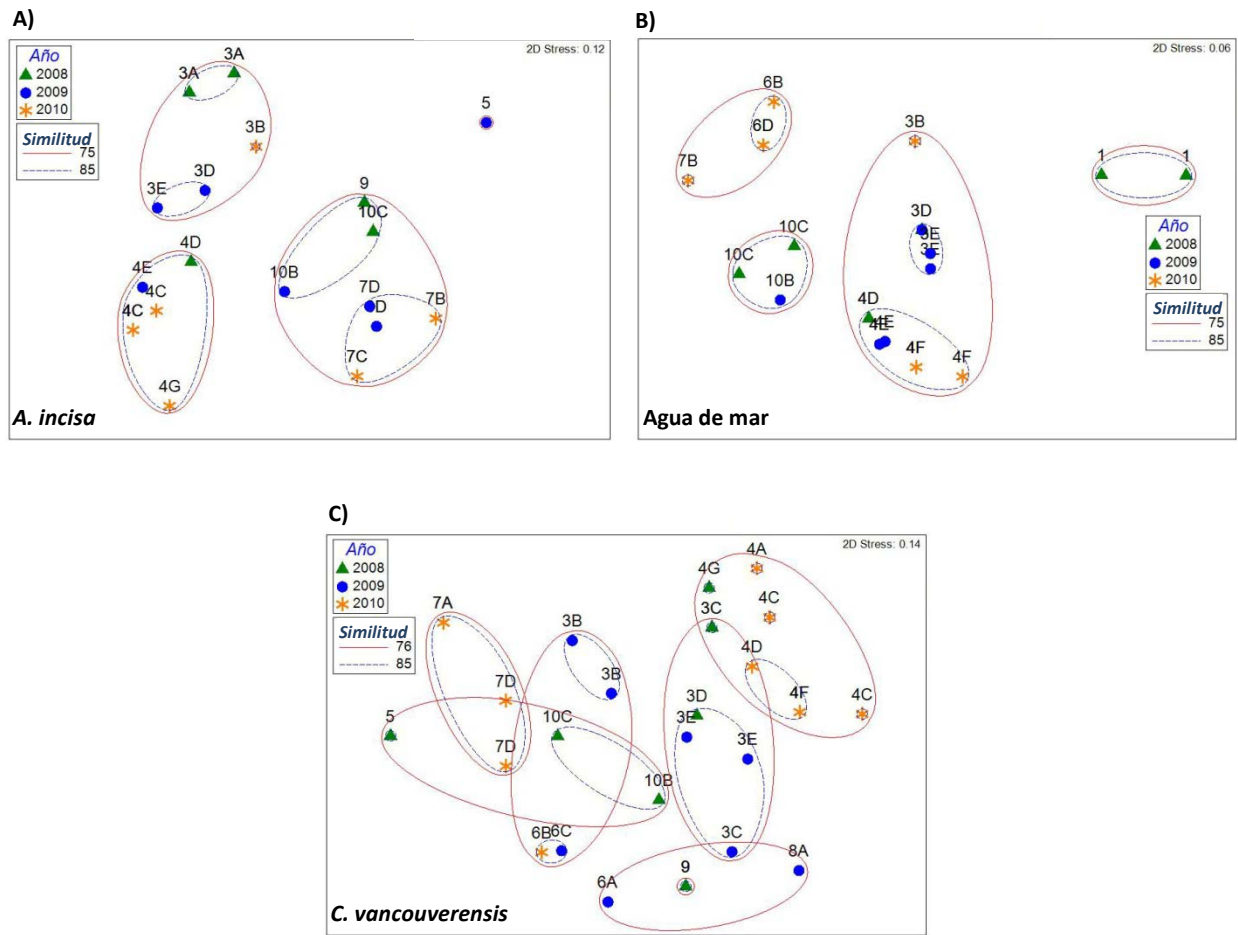


Figura 49. Análisis temporal representado en MDS mediante el coeficiente de emparejamiento simple para muestras bacterianas aisladas en Playa Esmeralda durante el 2008, 2009 y 2010. A) bacterias aisladas de erizo negro (*A. incisa*) en los diferentes años; B) bacterias aisladas de agua de mar en los diferentes años; C) bacterias aisladas de *C. vancouverensis* en los diferentes años. Los números en las gráficas representan los grupos metabólicos a los que pertenecieron las cepas. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

2.3.11 Análisis de la diversidad metabólica entre Punta baja y Playa esmeralda

El análisis de diversidad metabólica de bacterias aisladas de *S. purpuratus* (Punta Baja) y *A. incisa* (P. Esmeralda) en el 2008, mostró que las características metabólicas de las cepas bacterianas en el epitelio difirieron entre ambas especies de erizo. Las bacterias aisladas de cada localidad tendieron agruparse entre ellas (80%), sin embargo alguna de estas presentaron una similitud del 75% entre ambas especies de erizo (Fig. 50A). En general, el grupo 9 aisladas en *A. incisa*, fueron similares al grupo 8B de *S. purpuratus* (ver características metabólicas en apéndice II).

En la figura 50C se puede apreciar que la mayoría de las bacterias aisladas de Punta Baja se agruparon en la parte de arriba de la figura, mientras que las bacterias aisladas de Playa Esmeralda se agrupan en la parte baja de la figura. Por lo tanto, aunque las bacterias fueron aisladas de la misma especie de alga coralina, sus características metabólicas difirieron.

Para las muestras bacterianas de la temporada del 2009 se observó un patrón similar a la del 2008. En general, la mayoría de las bacterias aisladas de *A. incisa* mostraron diferencias en sus características metabólicas con las bacterias aisladas de *S. purpuratus*. Sin embargo, para esta temporada se observó una mayor cantidad de cepas bacterianas de *A. incisa* que compartían una similitud del 85% en sus características metabólicas con las bacterias aisladas de *S. purpuratus* (Fig. 51A). En las bacterias aisladas de agua de mar, observamos que existió una diferencia en las características metabólicas entre ambas localidades (Fig. 51B).

En la figura 51B, se puede apreciar que las bacterias aisladas en la localidad de Playa Esmeralda se agruparon a la izquierda de la figura, mientras que las bacterias de Punta Baja presentan una distribución más dispersa, donde la gran mayoría se agruparon del lado derecho de la figura, algo muy similar a lo observado para la temporada del 2008. Esto mismo se observó en las muestras tomadas del alga *C. vancouverensis* (Fig. 51C), en donde las bacterias aisladas de Punta Baja se agruparon principalmente a la derecha de la figura, mientras que las muestras de Playa Esmeralda presentaron una distribución un poco más dispersa, pero del lado izquierdo. Muy pocas bacterias presentaron una similitud del 75% en sus características metabólicas entre ambas localidades (Fig. 51C).

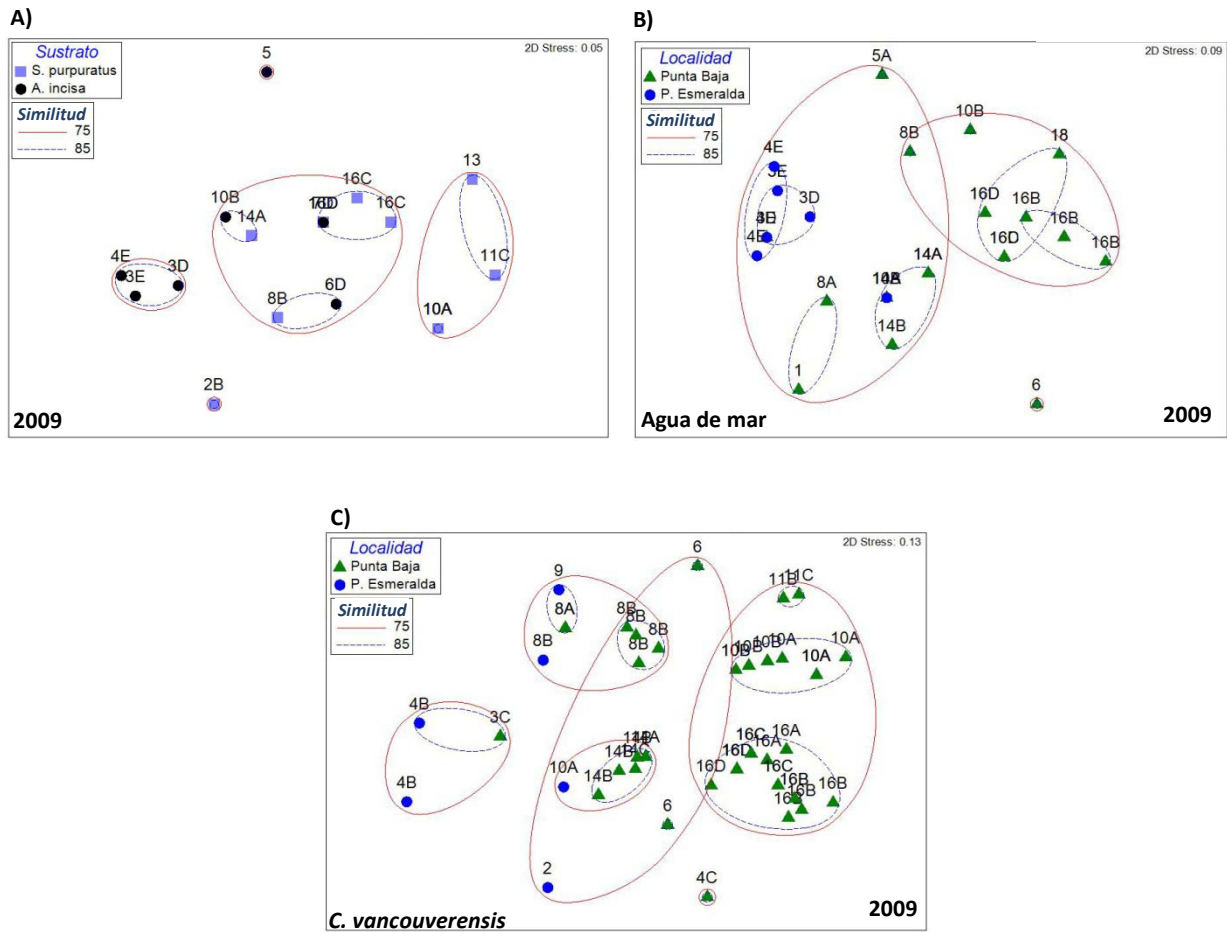


Figura 51. Análisis temporal representado en MDS mediante el coeficiente de emparejamiento simple para muestras bacterianas aisladas en Playa Esmeralda y Punta Baja durante el 2009. A) Bacterias aisladas de erizo negro (*P. Esmeralda*) y erizo morado (*Punta Baja*) B) bacterias aisladas de agua de mar; C) bacterias aisladas de *C. vancouverensis*. Los números en las gráficas representan los grupos metabólicos a los que pertenecen las cepas. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

El análisis realizado para la temporada del 2010, mostró algo totalmente diferente a lo observado para las temporadas del 2008 y 2009. Para las bacterias aisladas de *A. incisa* (*Playa Esmeralda*) y *S. purpuratus* (*Punta Baja*) no se observó una diferencia clara en las características metabólicas entre ambas localidades. Solamente 2 cepas de *A. incisa* (grupos metabólicos 7B y 7C) se agruparon de manera aislada y por lo tanto, mostraron ser metabólicamente diferentes del resto, pero en general no se encontraron diferencias entre ambas localidades (Fig.52A).

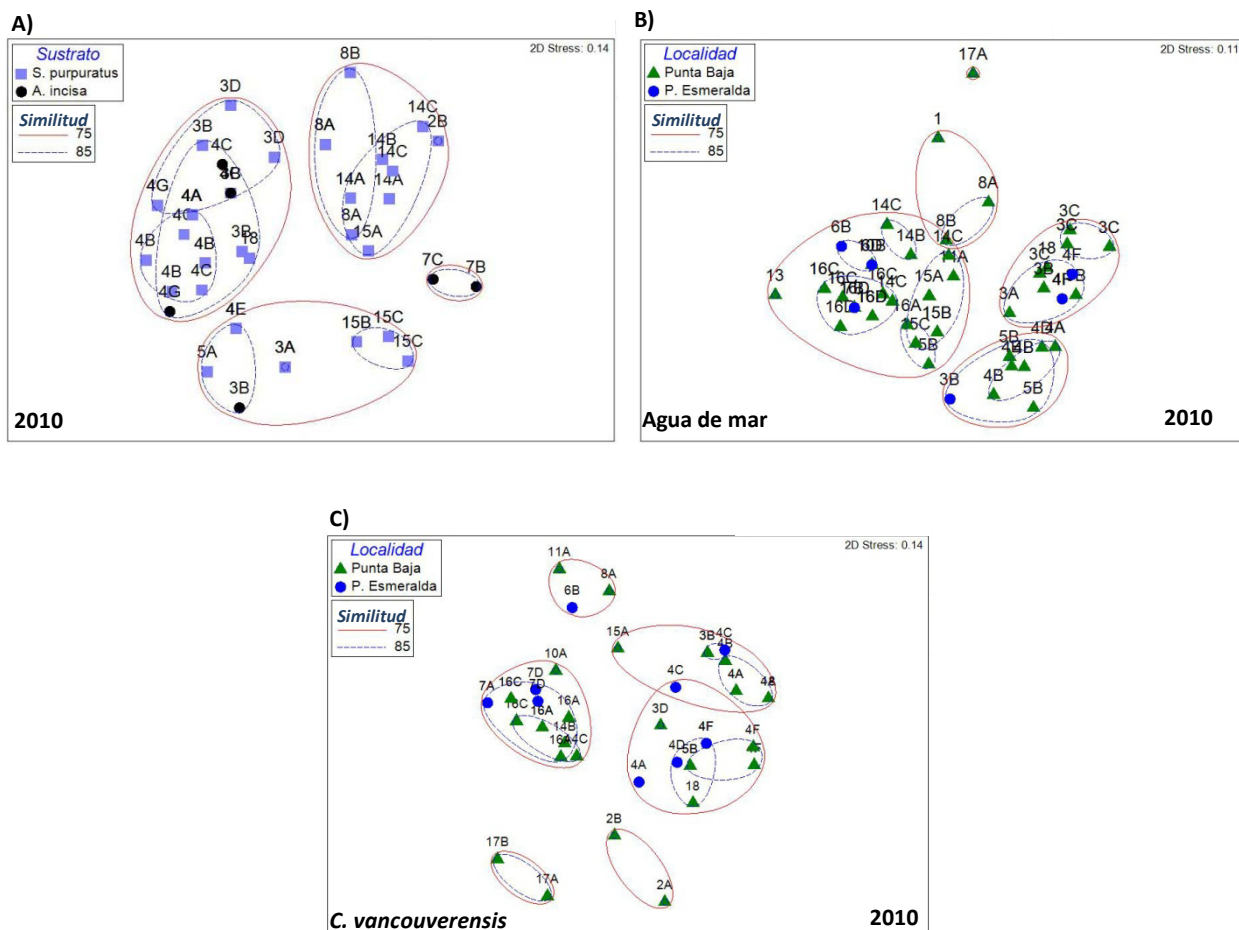


Figura 52. Análisis temporal representado en MDS mediante el coeficiente de emparejamiento simple para muestras bacterianas aisladas en Playa Esmeralda y Punta Baja durante el 2010. A) bacterias aisladas de erizo negro (P. Esmeralda) y erizo morado (Punta Baja) B) bacterias aisladas de agua de mar; C) bacterias aisladas de *C. vancouverensis*. Los números en las gráficas representan los grupos metabólicos a los que pertenecieron las cepas. Los círculos de similitud están representados en porcentajes.

De igual manera para las muestras aisladas de agua de mar, no hubo diferencia en las características metabólicas entre ambas localidades. De hecho la mayoría de las bacterias aisladas de la localidad de Playa Esmeralda, presentaron una similitud superior del 85% con algunos grupos de bacterias aisladas de Punta Baja (Fig. 52B). Lo mismo fue observado para las bacterias aisladas del alga *C. vancouverensis*, en donde algunas bacterias aisladas de la localidad de Playa Esmeralda presentaron una similitud por arriba del 85% con algunos grupos de bacterias aisladas de Punta Baja (Fig. 52C).

2.3.12 Ensayo de inducción a la metamorfosis de larvas de *S. purpuratus* con películas bacterianas mono-específicas

Un total de ocho cepas bacterianas aisladas de *S. purpuratus* y del alga *C. vancouverensis* de la localidad de Punta Baja de la temporada del 2007 fueron seleccionadas para llevar a cabo el experimento. A las 12 horas después de haber iniciado el experimento, la mayoría de las cepas aisladas de erizo morado mostraron una capacidad de inducir a la metamorfosis por arriba del 60% (Fig. 53A) mientras que para las cepas aisladas de *C. vancouverensis* solamente una cepa mostró un porcentaje por arriba del 60%. Se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos a las 12 horas de evaluación (ANOVA , una vía, $F= 6.525$, $P= <0.001$). Las diferencias en la respuesta de las larvas se encontraron con todas las cepas bacterianas a excepción de la cepa PB3zA1207.3 aislada de *C. vancouverensi* porque el análisis fue con respecto al control negativo (AMF). Las comparaciones múltiples de tratamientos por el método de Fisher (*LSD*) mostraron que estas diferencias eran significativas entre sí y con respecto al control negativo (AMF) ($P < 0.05$) (Fig. 53A). El porcentaje de metamorfosis con la cepa PB3zA1207.3 (5%) fue significativamente diferente con el resto de las cepas bacterianas utilizadas incluyendo el control positivo (KCl) ($P < 0.05$).

En cuanto a las cepas bacterianas aisladas de *S. purpuratus* en comparación con las aisladas de *C. vancouverensis*, se encontró que la cepa PB2z1207.1 de erizo morado fue la que mostró la mayor capacidad de inducir la metamorfosis en las larvas (88%), y fue la única que presentó diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos ($P < 0.05$). Las demás cepas aisladas de *S. purpuratus* y *C. vancouverensis* no mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellas ($P > 0.05$); sin embargo se observó que las cepas de *S. purpuratus* produjeron porcentajes de metamorfosis más altos que aquellas aisladas de *C. vancouverensis*, aunque estadísticamente no se vió reflejada esta diferencia (Fig. 53A).

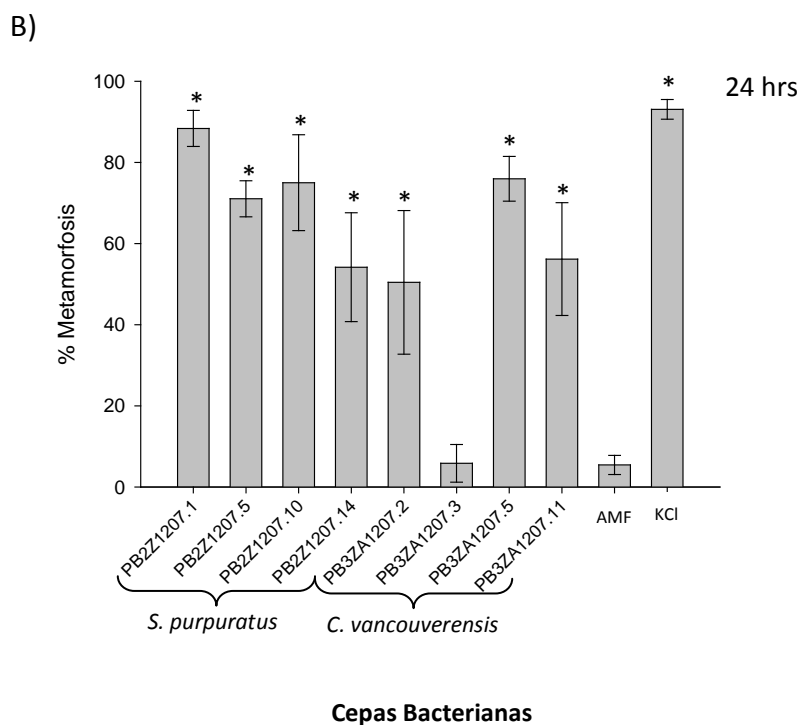
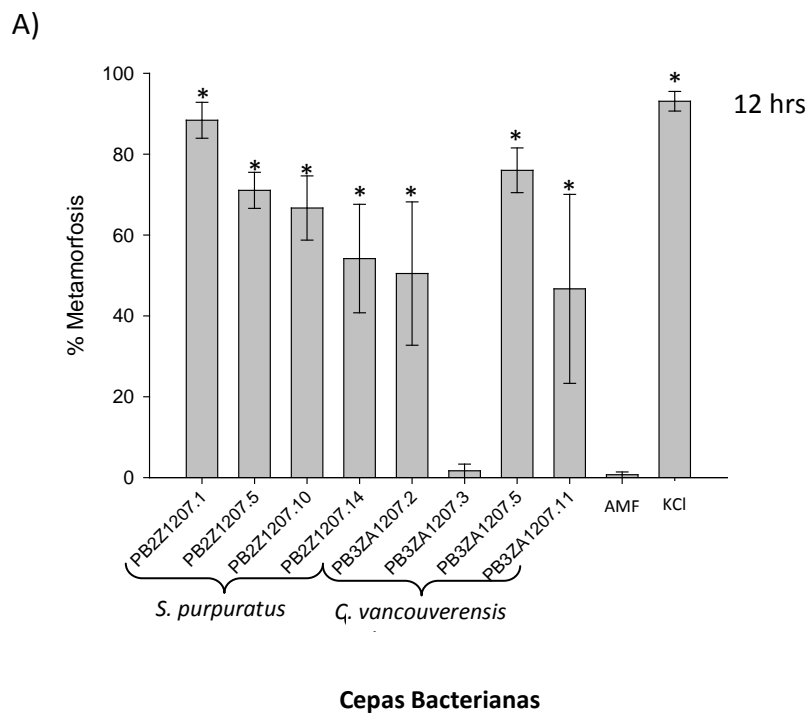


Figura 53.- Porcentaje de inducción a la metamorfosis de larvas competentes de *S. purpuratus* con películas bacterianas mono-específicas, A) porcentaje de metamorfosis a las 12 de evaluación; B) porcentaje de metamorfosis a las 24 horas de evaluación. Se incluyó un control positivo (KCl, 100 mM por 15 min) y un control negativo (AMF). Las líneas verticales indican el error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticas en relación al control negativo (AMF) donde $P < 0.05$.

Los porcentajes de metamorfosis observados a las 24 horas fueron muy similares a los observados a las 12 horas y no hubo un incremento significativo, a excepción de la cepa PB2z1207.10 de *S. purpuratus*, con la cual se alcanzó un porcentaje de metamorfosis cercano al 80% (Fig. 53B). Se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA, una vía, $F=11.62$, $P= <0.001$). Todas las cepas bacterianas a excepción de la PB3zA1207.3 fueron estadísticamente diferentes con respecto al control negativo (AMF) (LSD, $P < 0.05$) (Fig.53B). De igual manera a lo observado a las 12 horas, las cepas aisladas de *S. purpuratus* fueron capaces de inducir porcentajes de metamorfosis más altos en relación a las de *C. vancouverensis*; sin embargo estadísticamente no se observaron diferencias entre las cepas ($P < 0.05$). Las cepas PB2z1207.1, PB2z1207.5, PB2z1207.10 y PB3zA1207.5, presentaron los valores de metamorfosis más altos y no se encontraron diferencias significativas entre ellas ($P > 0.05$), pero si presentaron diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos ($P < 0.05$) (Fig. 53B). Las cepas bacterianas aisladas de *S. purpuratus* PB2z1207.1 y PB2z1207.14 pertenecieron al género *Vibrio* mientras que las cepas PB2z1207.5 y PB2z1207.10, pertenecieron al género *Pseudoaltermonas*. De igual manera, la cepas aisladas de *C. vancouverensis* PB3zA1207.5 y PB3zA1207.11 pertenecieron al género *Pseudoalteromonas*, mientras que la cepa PB3zA1207.2, perteneció al género *Vibrio*. La cepa PB3zA1207.3 no fue posible su identificación.

2.4 Discusión

2.4.1 Variación espacio-temporal de las comunidades bacterianas en Punta Baja y Playa Esmeralda

Es bien sabido que el género *Vibrio* se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo, incluyendo aguas oceánicas y costeras, sedimentos marinos, estuarios, en ambientes extremos como hielo polar y profundidades oceánicas (Thompson *et al.* 2004); además se ha visto en asociación con altas densidades de organismos marinos como corales (Rosenberg y Ben-Halm, 2002), peces (Huys *et al.* 2001), moluscos (Hayashi *et al.* 2003), entre otros (Martinez-Picado *et al.* 1996). Por lo anterior, es uno de los principales géneros de bacterias heterótrofas cultivables alrededor del mundo, el cual es considerado como un género cosmopolita, aunque en estudios recientes se ha visto que presenta un patrón de distribución latitudinal en relación a su abundancia, con concentraciones relativamente bajas en regiones tropicales y subtropicales y significativamente mayores en regiones templadas y polares (Wietz *et al.* 2010). De esta manera, no sorprende que en este trabajo haya sido el género más común encontrado (alrededor del 40%) en ambas localidades y principalmente asociado a *S. purpuratus* y *C. vancouverensis*. Es bien sabido, que este género puede llegar a causar enfermedades y altas mortalidades en organismos vertebrados e invertebrados. Se ha reportado que ciertas cepas de *V. splendidus*, biotipo 1, causan mortalidad en larvas del pez *Scophthalmus maximus* (Thompson *et al.* 2005), así mismo *V. splendidus*, biotipo II causan una alta mortalidad en estadios larvales en cultivos de ostión *Crassostrea gigas*, en la almeja *Pecten maximus* y en larvas y adultos de camarones (Sugumar *et al.* 1998; Gay *et al.* 2004).

Santiago-Gonzalez en el 2008, reportó la presencia de *V. splendidus* en las localidades de Baja Mar y Playa Esmeralda, en asociación con erizo morado y erizo negro. Debido a que en el presente trabajo no se logró la identificación a nivel especie, existe una alta posibilidad de la presencia de *V. splendidus* en las localidades de Punta Baja y Playa Esmeralda, principalmente en las bacterias que fueron aisladas de ambas especies de erizo. Por otro lado, se ha reportado que *V. anguillarum* y *V. alginolyticus* provoca la formación de lesiones en erizos adultos de *S. purpuratus* y *Paleopneustes cristatus*, sin embargo se ha documentado la presencia de ambas especies de bacterias en las poblaciones de erizo morado y se ha visto que su patogenicidad es

desencadenado a consecuencia de cambios ambientales (Gilles y Pearse, 1986; Bauer y Young, 2000). En el 2008, Santiago-Gonzalez reportó que *V. alginolyticus* se encuentra ampliamente distribuido en la costa norte de Baja California, y se encontró principalmente asociado a conchas de mejillón, erizo morado y algas rojas, por lo tanto, es muy probable que en la presente investigación encontremos esta especie bacteriana en asociación con erizo morado y algas coralinas, sin embargo estudios posteriores serán necesarios para identificar su presencia en las localidades de Punta Baja y Playa Esmeralda.

El segundo género más abundante fue *Pseudoalteromonas*, el cual constituyó cerca del 30% del total de las cepas bacterianas aisladas en la mayoría de los sustratos durante las diferentes temporadas. En estudios realizados sobre diversidad se ha visto que este género se encuentra principalmente en regiones templadas y polares (Pommier *et al.* 2005.); en relación a lo anterior, en el presente trabajo se encontró que la abundancia de este género fue mayor en Punta Baja, la cual es una región que se caracteriza por ser una zona templada con fuertes temporadas de surgencias en verano (Hernández de la Torre *et al.* 2004), mientras que la localidad de Playa Esmeralda se caracteriza por ser una zona de transición entre aguas templadas y subtropicales (Peraza *et al.* 1993; Palacios-Hernandez *et al.* 1996).

El tercer género más abundante encontrado en esta investigación fue *Halomonas*. Al igual que *Vibrio*, este es otro de los géneros que se considera cosmopolita, ya que son bacterias fáciles de cultivar y se han aislado en una gran diversidad de ambientes, pero se ha visto que prevalecen en profundidades oceánicas, chimeneas hidrotermales, suelos marinos y en asociación con algas marinas (Zifeng *et al.* 2009; Kaye *et al.* 2011). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que también son parte importante de las comunidades bacterianas asociadas a invertebrados marinos como el erizo morado (*S. purpuratus*), el erizo negro (*A. incisa*), algas coralinas (*C. vancouverensis*, *B. orbigniana*, *L. pacifica*, *C. chondracantus*) y agua de mar. Investigaciones futuras, serán necesarias para identificar a nivel especie cada una de las cepas aisladas que nos ayuden a un mejor entendimiento de su abundancia y diversidad, así como la elaboración de nuevos registros de estas especies para Baja California.

El cuarto y quinto grupo más abundante correspondió a los géneros *Flavobacteria* y *Photobacterium* (8 y 5%, respectivamente). *Flavobacteria* es un género de bacterias heterótrofas que pertenece al filo de los *Bacteroidetes* el cual, mediante estudios de metagenómica se ha visto

que constituye uno de los tres filos más abundantes en el océano, después de las α -*proteobacterias* y γ -*proteobacterias* que son las más abundantes (Ettema y Andersson, 2009). Se ha encontrado en una gran cantidad de ambientes marinos como lo son zonas costeras, mar abierto, sedimentos, chimeneas hidrotermales y regiones polares; además pueden encontrarse en estilo de vida libre o unido a agregados orgánicos; también se ha visto que pueden estar asociados al fitoplancton y animales marinos (Alonso *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2009). A pesar de su gran abundancia aparente, esto no se ha visto reflejado en las colecciones de bacterias cultivables cuando se compara con otros grupos como las *proteobacterias* (O'Sullivan *et al.* 2006). En este aspecto, se identificaron bacterias pertenecientes a este género en las dos localidades de muestreo, las cuales principalmente se encontraron asociadas a *S. purpuratus* y *C. vancouverensis*. Desafortunadamente las pruebas bioquímicas y moleculares no permitieron identificarlas a nivel especie, lo cual sería de mucho interés para determinar si las bacterias que se aislaron incrementaron su rango de distribución en ambientes marinos costeros, o bien pudieran ser nuevos miembros de la familia; por lo que es necesario realizar estudios a nivel molecular para su identificación a nivel de especie.

Cabe mencionar que las bacterias del género *Flavobacterium* aisladas de Playa Esmeralda, no se encontraron asociadas al erizo negro (*A. incisa*), pero si al alga roja *C. vancouverensis*; de esta manera sería interesante investigar a qué se debe esta diferencia, aunque cabe la posibilidad de que las bacterias asociadas a esta especie de equinodermo puedan ser de las no cultivables, de esta manera investigaciones futuras serán necesarias para identificar la presencia o no de este género en asociación con *A. incisa*.

En el caso del género *Photobacterium*, es extraño que se obtuviera un porcentaje muy bajo ya que se considera como una de las bacterias de fácil cultivo. Sin embargo, debido a que presentan muchas características metabólicas similares al género *Vibrio* (Urakawa *et al.* 1998), es probable que con las pruebas bioquímicas realizadas durante esta investigación no fuera posible su identificación y por lo tanto, fueron identificadas como *Vibrio*. Por tal motivo es necesario realizar estudios a nivel molecular para determinar la abundancia real de este género asociadas a las poblaciones de *S. purpuratus*. Por otro lado, *Photobacterium* fue encontrado asociado a la mayoría de los sustratos muestreados, sin embargo su abundancia fue menor en la localidad de Playa Esmeralda, en donde no se encontró asociado a erizo negro (*A. incisa*) ni a *C.*

vanouverensis. Lo anterior resulta interesante ya que al parecer este género es considerado como cosmopolita, por tal motivo, es necesario realizar investigaciones a nivel molecular más específicas para determinar la abundancia real de este género en ambas localidades.

Los géneros que representaron entre el 1 y 3% de abundancia del total de las cepas bacterianas aisladas, fueron *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Moraxella*. A pesar de que los géneros *Enterobacteriaceae* y *Aeromonas* forman parte del filo de las γ -*proteobacterias* (las cuales son el segundo filo más abundante en el océano), representan uno de los géneros menos cultivables en ambientes oceánicos. El género de las *Enterobacteriaceae* se considera principalmente como indicador de contaminación antropogénico (Salas, 2000). En relación a lo anterior, en el presente trabajo se registró la presencia de *Enterobacteriaceae*, principalmente en muestras de agua de mar en la localidad de Punta Baja, sin embargo también fue identificado aunque en menor abundancia en *S. purpuratus* y *C. vanouverensis*. También fue encontrado en la localidad de Playa Esmeralda, aunque representó menos del 1% del total de las cepas aisladas. Es importante mencionar que ambas localidades de muestreo son importantes campos pesqueros para la región de Baja California, por lo tanto, existe la posibilidad de que la presencia de este género de bacterias en ambos sitios, sea por aportes antropogénicos. Investigaciones futuras serán necesarias para determinar si este grupo de bacterias proviene de aguas residuales (indicadores de contaminación), o si bien forma parte habitual de las comunidades bacterianas adaptadas al ambiente marino costero.

En relación al género *Aeromonas* (2%) se ha visto que es uno de los principales géneros patógenos causantes de enfermedades tanto en humanos como en vertebrados e invertebrados marinos generando mortalidades masivas en la acuicultura de especies de interés comercial (Olafsen *et al.* 1993; Dumontet *et al.* 2000; Olafsen, 2001; Loch y Faisal, 2010). Así mismo, se ha visto que forma parte en las comunidades bacterianas asociadas a ciertas especies de corales, sin causar efectos aparentemente (Rhower *et al.* 2002). Sin embargo, se ha visto que la cepa *Aeromonas salmonicida* es un patógeno oportunista que causa lesiones graves en el erizo morado adulto (Gilles y Pearse, 1986). Por otro lado, se ha reportado que esta cepa tiene una amplia distribución en el mundo (Wiklund y Dalsgaard, 1998), pero se cree que es más abundante en zonas tropicales y subtropicales. Esto resulta interesante, ya que en la localidad de Playa Esmeralda su abundancia fue relativamente mayor a la encontrada en Punta Baja, además fue

aislada principalmente de *A. incisa* durante dos temporadas seguidas, en comparación con la localidad de Punta Baja, en donde *Aeromonas* se encontró principalmente en muestras de agua de mar, y fue poco abundante en muestras de *S. purpuratus* y *C. vancouverensis*. Por lo tanto, sería interesante investigar si la mayor abundancia obtenida en Playa Esmeralda se debe a que es una zona de transición entre aguas templadas y subtropicales y por lo tanto favorece su abundancia y permanencia en este sitio. Así mismo, sería interesante investigar si es potencialmente patógeno para *A. incisa* o si bien es un miembro frecuente en las comunidades bacterianas asociadas a esta especie de equinodermo.

El género *Pseudomonas* es otro de los integrantes del grupo de las γ -proteobacterias y mediante estudios de diversidad por medio de técnicas independientes a cultivos bacterianos, es considerado como uno de los miembros más comunes en las comunidades bacterianas en el ambiente marino (Spiers *et al.* 2000), sin embargo son pocas las especies de este género que han sido cultivadas. También se sabe que este género vive en asociación con ciertas especies de invertebrados marinos, en donde se han aislado a partir de esponjas (Romanenko *et al.* 2008) y ciertas especies de coral (Rohwer *et al.* 2001; Rohwer *et al.* 2002); además también se ha aislado en muestras tomadas de erizo morado en la costa oeste de California (Gilles y Pearse, 1986). En este último, se pensó que este género podría ser patógeno para el erizo morado, sin embargo no se observó que causara enfermedades. En relación a lo anterior, en este trabajo aislamos *Pseudomonas* en muestras de agua de mar y solamente una cepa fue aislada a partir de *S. purpuratus* en Punta Baja, sin embargo, para la localidad de Playa Esmeralda no se encontró. El hecho de haber encontrado muy pocas bacterias de este género, probablemente se deba a que no es muy fácil su cultivo y por lo tanto requiere de medios de cultivo muy específicos. Trabajos posteriores mediante técnicas independientes al cultivo, serán necesarios para determinar la abundancia e importancia del género *Pseudomonas* asociadas a las poblaciones de *S. purpuratus* a lo largo de la península de Baja California.

Por último, los géneros que representaron menos del 1.5% del total de las cepas, correspondieron a los géneros de *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Alteromonas* y *Sulfitobacter*. Los primeros cinco géneros pertenecen al filo de los *Firmicutes*, dentro del grupo de las bacterias Gram positivas, el cual represento solo el

5% del total de las cepas aisladas. Anteriormente se pensaba que las bacterias Gram positivas comprendían solamente el 5% de las bacterias en el océano; sin embargo, estudios recientes sugieren que su abundancia y diversidad en ambientes marinos puede ser considerablemente mayor, principalmente en sedimentos marinos en donde se ha visto que el uso de medios de cultivo a base de agua de mar bajos en nutrientes, favorece el crecimiento de este grupo de bacterias (Stach y Bull, 2005; Gontang *et al.* 2007). En relación a lo anterior, es posible que en la presente investigación se encontró una baja abundancia de bacterias Gram positivas, debido a que se utilizó un solo medio de cultivo rico en nutrientes como reportan Gontang *et al.* (2007), por lo tanto en investigaciones futuras será necesario utilizar diferentes medios de cultivo que nos permitan determinar de manera más exacta la abundancia de este grupo en la zona costera de Baja California.

El género *Bacillus* se caracteriza por ser bacterias heterótrofas, tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas y se considera como una especie cosmopolita. Además, estudios recientes han demostrado su asociación con invertebrados marinos (Du *et al.* 2010). Lo anterior, pudiera explicar su presencia asociada a las superficies de *S. purpuratus*, *M. californianus* y el alga *C. vancouverensis* solamente para la localidad de Punta Baja en la temporada del 2009 y en 2010 para erizo morado y *C. vancouverensis*. Por otra parte, su ausencia en las muestras de Playa Esmeralda no significa que no se distribuya en esa zona, para determinar lo anterior, será necesario utilizar medios de cultivo con base en agua de mar bajos en nutrientes como lo mencionan Gontang *et al.* (2007), los cuales se ha visto que favorecen su crecimiento y poder determinar su abundancia en esta localidad, así como corroborar también los valores iniciales obtenidos para la localidad de Punta Baja.

Los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus* incluyen bacterias asociadas principalmente a enfermedades humanas, y son utilizadas como indicadores de contaminación en zonas costeras (Romano y Mejia, 2003; Ferguson *et al.* 2005; Harakeh *et al.* 2006; Naimi *et al.* 2007). La presencia de *Streptococcus* aislado a partir de *M. californianus* en la temporada del 2009 para la localidad de Punta Baja representa un caso único y es el primer registro de este género en esta localidad. Se ha documentado ciertas especies de *Streptococcus* son patógenos a varias especies de peces de agua dulce y agua salada, principalmente la especie *Streptococcus*

iniae la cual ha causado mortalidades masivas en el área de la acuicultura (Kvitt y Colorni, 2004; Suanyuk *et al.* 2010). Sin embargo hasta ahora no se ha documentado su abundancia en las costas de Baja California y sus posibles efectos que pueda tener como patógenos en invertebrados marinos.

En relación al género *Enterococcus*, se ha documentado que la especie *Enterococcus seriolicida* es causante de enfermedades en peces de interés comercial en Japón (Kusuda *et al.* 1991), además su presencia en ambientes marinos se ha correlacionado con eventos de contaminación antropogénica (Ferguson *et al.* 2005). Hasta el momento no hay registro sobre especies del género *Enterococcus* en la región de Baja California, por lo que su presencia encontrada en la presente investigación en la localidad de Punta Baja, pudiera estar indicando eventos de contaminación antropogénica en la región. Así mismo, cabe aclarar que la abundancia de este género representó menos del 1% del total de las cepas, sin embargo será necesario realizar estudios sobre la presencia y abundancia de este género en la localidad, que ayuden a prevenir problemas de contaminación antropogénica en la localidad, debido a que representa uno de los campos pesqueros más importantes en la región.

Hasta el momento poco se sabe sobre la distribución y abundancia de bacterias del género *Staphylococcus* en el océano, sin embargo ciertos estudios han revelado que se encuentran presentes naturalmente en ambientes marinos, principalmente en agua, sedimentos y arena (Gunn y Colwel, 1983). En el presente estudio, se reporta la presencia de una cepa perteneciente a este género, asociada a *C. vancouverensis* para la localidad de Playa Esmeralda en la temporada del 2009. Por lo tanto, representa uno de los primeros registros sobre la presencia del género *Staphylococcus* en asociación con organismos marinos en el intermareal. Estudios posteriores serán necesarios para determinar su abundancia y frecuencia en ambientes intermareales, así como su importancia ecológica en la región.

Por otro lado, el género *Micrococcus* pertenece al grupo de las *Actinobacterias*, las cuales se consideran las más importantes desde el punto de vista farmacológico, debido a que más de la mitad de los compuestos bioactivos extraídos de ambientes marinos, son producidos por este género (Lazzarini *et al.* 2000). Se sabe que forma parte importante de la flora marina y principalmente se encuentran en sedimentos marinos (Wood, 1952; Annamalai *et al.* 2010); aunque se ha visto que forma asociación con invertebrados marinos como en ciertas especies de

esponjas, en donde se ha aislado y caracterizado; además se ha visto que son importantes productoras de compuestos bioactivos (Hentschel *et al.* 2001). En relación a lo anterior, se encontró una cepa de *Micrococcus* sp asociada a epitelio de *S. purpuratus* para la temporada del 2009, así mismo encontramos otra en la alga roja *B. orbigniana* en la temporada del 2008, ambas cepas aisladas de la localidad de Punta Baja. Resulta interesante observar que este género tuvo presencia en dos de las tres temporadas de muestreo, lo que nos puede sugerir que probablemente sea un habitante común en el intermareal rocoso y muy probablemente asociado a invertebrados marinos. Así mismo, será necesario realizar investigaciones para determinar la identidad de ambas cepas y valorar su importancia como productores de compuestos bioactivos o si son de importancia para la generación de compuestos inductores de la metamorfosis en *S. purpuratus*.

El género *Alcaligenes*, pertenece al grupo de las β -proteobacterias el cual constituye uno de los grupos con menor abundancia en el océano, sin embargo se sabe que forma parte del bacterioplancton y en asociación a ciertos invertebrados marinos, principalmente esponjas (Li *et al.* 2006). Actualmente es poca la información en la literatura que documente su distribución y abundancia en el océano. En este trabajo, se encontraron dos cepas identificadas como *Alcaligenes* sp, una fue aislada a partir del alga *C. vancouverensis* y la otra a partir de muestras de agua de mar, ambas en la localidad de Punta Baja para la temporada del 2009. De esta manera, representa el primer registro sobre la presencia de este género en el intermareal rocoso en la localidad de Punta Baja, Baja California; sin embargo investigaciones posteriores serán necesarias para determinar su abundancia y distribución en la región, así como su importancia ecológica y aplicación biotecnológica si es posible.

El género *Alteromonas* pertenece al grupo de las γ -proteobacterias, el segundo grupo más abundante en el océano, sin embargo existen dificultades en determinar su abundancia en el océano debido a que comparte muchas similitudes con el género *Pseudoalteromonas*. Recientemente, gracias al uso de las técnicas moleculares y comparación de secuencias del 16S rDNA, se ha incrementado el número de propuestas sobre nuevas especies de *Alteromonas* en el océano, las cuales han sido aisladas de agua de mar, asociados a organismos marinos como macroalgas e invertebrados, así como de chimeneas hidrotermales (Ivanova *et al.* 1996; Raguénès *et al.* 1997; Sawabe *et al.* 2000). En relación a lo anterior, en este trabajo se encontraron cepas pertenecientes a este grupo, aisladas a partir de muestras del alga roja *C. vancouverensis* en la localidad de Punta Baja para la temporada del 2010. Sin embargo, es

necesario realizar investigación sobre estas cepas para determinar a qué especie pertenecen o si forman parte de un nuevo grupo de este género.

El género *Sulfitobacter* es miembro del grupo de las α -*proteobacterias*, y está constituido por siete especies bacterianas, las cuales juegan un papel fundamental en el ciclo del sulfuro orgánico en el océano. Es un género relativamente nuevo (creado en 1995) y está constituido principalmente por bacterias heterótrofas, las cuales han sido aisladas en diferentes ambientes marinos alrededor del mundo y por lo tanto se consideran cosmopolitas, así mismo se han encontrado asociados a diferentes sustratos como son agua de mar, sedimentos e invertebrados marinos (Labrenz *et al.* 2000; Yoon *et al.* 2007). En relación a lo último mencionado, la cepa *Sulfitobacter delicatus* y *Sulfitobacter dubius* fueron aisladas a partir de equinodermos (*Stellaster equestris*) y pastos marinos (*Zostera marina*) respectivamente, obtenidas del Pacífico Oriental (Ivanova *et al.* 2004). En el presente trabajo, se aisló una cepa perteneciente al género *Sulfitobacter* identificada mediante el gen 16S rDNA, la cual tuvo una identidad del 98% con *Sulfitobacter pontiacus* aislada en 1995 en el Mar Negro (Sorokin, 1995). Esta bacteria fue encontrada en el epitelio de *S. purpuratus* en la temporada del 2007 para la localidad de Punta Baja, y no se volvió a encontrar en las temporadas posteriores. Por otro lado, es necesario realizar más pruebas de identificación para tener la seguridad de su identidad y por lo tanto, esto representaría el primer registro para esta especie asociada a poblaciones de *S. purpuratus* en el Pacífico Mexicano, así mismo es necesario determinar su importancia en las comunidades bacterianas debido a su metabolismo característico, así como su importancia ecológica en la región.

Hasta el momento, son pocos los trabajos que documenten la diversidad y distribución de bacterias heterótrofas cultivables asociadas a las poblaciones de erizo morado a lo largo de su distribución en Baja California. En este aspecto, Santiago-González (2008), realizó durante el año 2006 el primer estudio a mesoescala sobre la composición y variación de comunidades bacterianas (fracción cultivable) asociadas a las poblaciones de adultos de *S. purpuratus*, en pozas de intermareal en cinco localidades a lo largo del Estado de Baja California. Entre sus resultados, reportó la presencia de cuatro géneros bacterianos que correspondieron a *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Paracoccus* y *Photobacterium*, siendo los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* como los más abundantes. A diferencia a lo reportado por Santiago-

González (2008), en el presente trabajo se encontró un total de 17 géneros bacterianos, sin embargo en ninguna temporada identificamos la presencia del género *Paracoccus*, el cual fue reportado por Santiago-González en 2006, lo anterior posiblemente se deba a que *Paracoccus* fue reportado para la localidad de Bajamar localizado al norte de la ciudad de Ensenada, el cual no fue incluido en la presente investigación. De igual manera a lo reportado por Santiago-González (2008), se encontró que los géneros *Vibrio* y *Pseudoaltermonas* fueron los más abundantes durante este trabajo. Con base en lo anterior, pudiéramos aventurarnos a decir que ambos géneros pueden estar jugando un papel muy importante en las comunidades bacterianas asociadas principalmente a invertebrados marinos (*S. purpuratus* y *A. incisa*) y algas coralinas (*C. vancouverensis*, *L. pacifica* y *B. orbigniana*), sin embargo, investigaciones futuras que nos ayuden a determinar la diversidad bacteriana mediante métodos independientes de cultivo, serán vitales para poder llegar a entender con mayor detalle la importancia de *Vibrio* y *Pseudoaltermonas* en la zona intermareal. Por otro lado, se encontró que el género *Halomonas* fue el tercero más abundante después de *Vibrio* y *Pseudoaltermonas*, así mismo, siempre fue encontrado en todas las temporadas en los dos sitios de muestreo, y en todos los sustratos muestreados. Es de llamar la atención que el género *Halomonas* no fuera reportado por Santiago-González (2008), ya que al parecer nuestro estudio mostró que es parte importante de la flora bacteriana en el intermareal rocoso.

En cuanto a la distribución espacio-temporal de los géneros bacterianos reportados por Santiago-González (2008) en el 2006; encontró que existe una variación espacial y temporal a lo largo de la costa de Baja California. Sin embargo es importante mencionar que la variación espacial reportada por Santiago-González (2008) fue a nivel mesoescala (5 localidades en la región de Baja California) y por lo tanto, se esperaba que existiera una variación espacio-temporal. A diferencia de lo realizado por Santiago-González (2008), en el presente trabajo se determinó el grado de variabilidad de las comunidades bacterianas heterótrofas cultivables en una sola localidad, con la finalidad de conocer que tanto cambian las comunidades bacterianas en una escala de centímetros a metros; en donde se determinó que la variación espacio-temporal en la composición de grupos bacterianos cultivables encontrada en la localidad de Punta Baja, resulta muy interesante ya que no solamente la variación espacio-temporal es a nivel de mesoescala como lo reportó Santiago-González (2008) sino también a nivel de microescala.

Así mismo, también se observó que ciertos géneros bacterianos permanecieron en las diferentes temporadas para ambas localidades, por ejemplo el género *Vibrio* siempre se encontró asociado a la mayoría de los sustratos durante todas las temporadas, lo único que varió fue su abundancia entre las distintas temporadas y lo mismo fue observado para los géneros *Pseudoalteromonas* y *Halomonas*. Esto probablemente se puede deber a que estos géneros son cosmopolitas y habitan en ambientes muy variables, lo cual hace que puedan ser encontrados en una gran variedad de sustratos.

Por otro lado, al comparar la composición de géneros bacterianos entre ambas localidades, encontramos que difieren significativamente, lo que resultó muy similar a lo que observó Santiago-González (2008) al comparar la composición de géneros entre las diferentes localidades a lo largo de la Península de Baja California. Esto es interesante ya que en ambas localidades los géneros más comunes y abundantes fueron los mismos (*Vibrio*, *Pseudoalteromonas* y *Halomonas*) por lo tanto, es probable que estas diferencias se deban a cambios en las condiciones ambientales. Se ha documentado que cambios en pH pueden alterar los patrones de distribución de ciertos grupos bacterianos que habitan en suelos marinos (Fierer y Jackson, 2006), así mismo la estructura de las comunidades del bacterioplancton cambian a lo largo de gradientes de salinidad (Crump *et al.* 2004), así como las comunidades de cianobacterias en incrementos de temperatura en temporadas de verano (Ward *et al.* 1998). También se ha documentado que cambios en las condiciones ambientales como: disponibilidad de sustrato, intensidad de luz, disponibilidad de alimento, condiciones oceanográficas como eventos de El Niño, pueden inducir cambios en los patrones de distribución y composición de las comunidades bacterianas (Buckley y Schmidt, 2002; Horner-Devine *et al.* 2004; McArthur, 2006).

2.4.2 Variación espacio-temporal de las características metabólicas bacterianas en Punta Baja y Playa Esmeralda

En general, se puede decir que la mayoría de las bacterias heterótrofas cultivables aisladas en el presente trabajo pertenecieron al grupo de las Gram negativas (95%), son bacterias móviles y anaerobias facultativas, lo cual es similar a lo reportado por Santiago-González (2008). El 90% requiere de sal para su crecimiento, lo cual indica que se trata de bacterias exclusivas del ambiente marino; esto es muy contrastante con lo reportado por Santiago-

González (2008) en donde el 80% de las bacterias tuvieron la capacidad de crecer en medios de cultivo sin presencia de sal. Es bien sabido que las bacterias de origen marino y principalmente las pertenecientes al grupo de las Gram negativas, es necesaria la presencia de cloruro de sodio (aunque sea en concentraciones bajas) para su crecimiento (MacLeod, 1965; Reichelt y Baumann, 1974; Gow, 1992), por lo tanto existe la posibilidad que muchas de las bacterias encontradas por Santiago-González (2008) pudieran ser de origen terrestre. En base a lo anterior, es necesario realizar investigaciones futuras sobre el aporte y abundancia de bacterias de origen terrestre en el intermareal rocoso. Por otro lado, el análisis de diversidad espacio-temporal en las características metabólicas realizado por Santiago-González (2008), mostró que existe una alta variabilidad en el metabolismo de cepas aisladas para un sustrato en particular, sin embargo en la mayoría de los sustratos se encontraron bacterias con perfiles metabólicos muy similares. En el presente trabajo se encontró una alta variación espacial (entre transectos y zonas del intermareal) en el perfil metabólico de bacterias aisladas para cada uno de los sustratos por separado, sin embargo se observó que muchos grupos metabólicos estuvieron presentes en la mayoría de los sustratos aunque en menor proporción, lo cual es muy similar a lo reportado por Santiago-González (2008). Estudios recientes han mostrado que en tan solo un gramo de sedimento marino existe una alta diversidad de bacterias con perfiles metabólicos diferentes, esto significa que aerobios obligados, anaerobios facultativos y anaerobios obligados viven muy próximos unos a otros y por lo tanto, es posible encontrar organismos autótrofos, aerobios y anaerobios heterótrofos en ambientes en donde al parecer son relativamente homogéneos, aun así es posible encontrar una gran cantidad de microambientes (Kasen y Rainey, 2004). De esta manera, con base en lo anterior, se puede explicar la alta diversidad de grupos metabólicos que encontramos en los diferentes sustratos y zonas del intermareal. Sin embargo, llama la atención que alrededor del 95% del total de las bacterias aisladas en ambas localidades fueron anaerobias facultativas, lo cual da una idea sobre la adaptabilidad de estas bacterias para sobrevivir en este tipo de ambientes intermareales, en donde cambios en la concentración de oxígeno puede ser significativa a consecuencia de los cambios abruptos de temperatura principalmenten entre mareas altas y bajas.

A pesar de la alta variación espacial de los grupos metabólicos bacterianos, se observó que para cada sustrato hubo un grupo metabólico característico, el cual fue el más abundante. Por otro lado, se observó que los grupos metabólicos encontrados en Punta Baja fueron muy

diferentes a los encontrados en Playa Esmeralda, lo cual fue algo muy similar a lo encontrado por Santiago-Gonzalez (2008). De esta manera, sería interesante en estudios posteriores determinar a que se debe la abundancia de grupos metabólicos característicos de cada sustrato y determinar si existe alguna selección por parte del organismo sustrato (erizo o alga coralina). En relación a esto, trabajos realizados sobre la diversidad de bacterias heterótrofas cultivables en la anemona *Anthopleura midori*, identificaron una alta variabilidad de géneros bacterianos, en donde el género *Pseudoalteromonas* fue uno de los más abundantes. Así mismo, se cree que la anemona puede estar involucrada en la selección de este grupo de bacterias mediante la expulsión de compuestos metabólicos secundarios (Du *et al.* 2010).

Por otro lado, es interesante mencionar que a pesar de que existe una variación espacio-temporal de géneros bacterianos, los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* fueron encontrados en todas las temporadas en la mayoría de los sustratos, probablemente esto se deba a que son bacterias cosmopolitas y tienen la capacidad de adaptarse a una gran variedad de ambientes. Sin embargo, la variación espacio-temporal de los grupos metabólicos encontrada para ambos géneros fue muy significativa, lo cual pudiera estar indicando dos cosas: 1) es posible que exista una gran diversidad de especies pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas*, ya que observamos una gran variación espacio-temporal de los grupos metabólicos en las temporadas en las que estos géneros fueron muy abundantes, 2) o bien son pocas las especies pertenecientes a estos géneros, pero estas bacterias cuentan con diferentes capacidades metabólicas, lo cual puede depender de las condiciones bióticas y abióticas de la localidad en ciertos momentos. En relación a lo último mencionado, es bien sabido que ciertas especies bacterianas tienen la capacidad de presentar diferentes biotipos o cepas con capacidades metabólicas diferentes, esto es posible mediante la adquisición de material genético extracelular, como plásmidos. Estos les confieren nuevas capacidades metabólicas, sin embargo siguen siendo la misma especie. Lo anterior ha sido observado en *Vibrio splendidus*, el cual presenta dos biotipos con capacidades metabólicas diferentes (Gómez-León *et al.* 2005). Por lo tanto, es necesario realizar estudios más a detalle de los géneros más abundantes encontrados, para identificar estas bacterias a nivel especie y así poder determinar a qué se debe esta alta variación metabólica encontrada en ambas localidades.

2.4.3 Inducción a la metamorfosis en larvas de *S. pupuratus*, con películas bacterianas mono-específicas aisladas de Punta Baja

Se ha demostrado que las bacterias pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas*, son importantes para inducir el asentamiento y la metamorfosis en larvas de diferentes invertebrados marinos (Negri *et al.* 2001; Lau *et al.* 2002; Huang y Hadfield, 2003; Huang *et al.* 2007); en donde para la región de Baja California, Santiago-González (2008) reportó que cepas bacterianas pertenecientes a estos géneros, indujeron a la metamorfosis a larvas de erizo morado por arriba del 50%, algo muy similar a lo encontrado en el presente trabajo, en donde bacterias de estos géneros indujeron a las larvas de erizo morado por arriba del 60% de metamorfosis. Por otro lado en la presente investigación, tanto las cepas obtenidas a partir de erizo morado como de *C. vancouverensis*, indujeron a la metamorfosis por arriba del 50% y solamente tres por arriba del 70% a las larvas de erizo morado. Cabe recordar que en el análisis de diversidad de géneros bacterianos, la diversidad bacteriana entre ambos sustratos fue más similar entre ellos, que en relación con el resto de los sustratos; además los géneros *Vibrios* y *Pseudoalteromonas* fueron de los más característicos para ambos sustratos, por lo tanto es posible que ambos géneros jueguen un papel importante para la generación de señales ambientales para la selección de los sustratos adecuados por parte de las larvas para iniciar el proceso de la metamorfosis.

Algunos estudios han revelado que las comunidades bacterianas asociadas a invertebrados marinos son específicas, es decir mantienen un cierto grupo de bacterias que producen ciertos tipos de señales ambientales para inducir a diversos tipos de larvas y así asegurar su supervivencia (Lau *et al.* 2005; Dworjanyn y Pirozzi, 2008). Esto fue observado por Díaz-Pérez (2006), en donde larvas competentes de erizo blanco *Lytechinus pictus* metamorfosearon por arriba del 85% en películas bacterianas generadas en presencia de sus congéneres adultos a diferencia de biopelículas generadas en diferentes condiciones; además este autor observó que la composición de géneros bacterianos fue diferente a lo que se presentó en el resto de las biopelículas, concluyendo que es necesario que las biopelículas tengan ciertas características en cuanto a la composición de géneros bacterianos. Así mismo, Qian y colaboradores (2003), mostraron que cambios en la composición de géneros en las comunidades bacterianas disminuían el porcentaje de metamorfosis de larvas de *Balanus amphitrite*. De esta

manera, con base en los resultados obtenidos es muy probable que a pesar de que existe una variación espacio-temporal de géneros bacterianos en la localidad de Punta Baja, los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* siempre estuvieron presentes en el epitelio de *S. purpuratus* y la superficie del alga *C. vancouverensis* en todas las temporadas y zonas del intermareal, resulta posible que estos géneros sean parte fundamental de las comunidades bacterias e importantes para la generación de señales ambientales para el asentamiento y metamorfosis de las larvas de *S. purpuratus* en el intermaeal rocoso.

2.4.4 Conclusiones

Las comunidades bacterianas heterótrofas cultivables asociadas a organismos en el intermareal rocoso, variaron espacial y temporalmente (para cada una de las localidades por separado) en cuanto a su composición de géneros bacterianos y en sus características metabólicas. Por lo tanto no se encontró que existiera una correlación entre las diferentes zonas del intermareal y transectos. Los géneros bacterianos *Vibrio* y *Pseudoalteromas* fueron los más abundantes en las dos localidades de muestreo y se encontraron principalmente asociados a erizos adultos morados (*S. purpuratus*) y al alga coralina *C. vancouverensis*.

Así mismo, encontramos que existe una variación temporal en la composición de géneros bacterianos en los diferentes sustratos entre las localidades de Punta Baja y Playa Esmeralda, dicha variación es posible que se deba a las condiciones oceanográficas de la región. La localidad de Playa Esmeralda, es una zona de transición entre aguas templadas y subtropicales con escasos eventos de surgencias, y menor aporte hacia la superficie de agua fría rica en nutrientes. Por otro lado, la localidad de Punta Baja es una región con predominancia de agua templada y fuertes eventos de surgencias, los cuales llevan a la superficie agua fría y rica en nutrientes. De esta manera, es muy probable que debido a las condiciones oceanográficas en Punta Baja y la alta productividad que existe en esta región, fue el lugar en donde se encontraron una mayor cantidad de géneros bacterianos; sin embargo, estudios con métodos independientes a el crecimiento en cultivo de cepas bacterianas, serán necesarios para llevar a cabo una caracterización completa de las localidades y tener una mejor idea sobre la diversidad y variabilidad de las comunidades bacterianas asociada a los organismos en el intermareal rocoso.

Por otro lado, encontramos que las bacterias aisladas a partir de *S. purpuratus* y *C. vancouverensis* tuvieron la capacidad de inducir a la metamorfosis por arriba del 60%, a larvas competentes de la especie; así mismo estudios anteriores han reportado la importancia de estos géneros para la generación de señales ambientales inductores de la metamorfosis en larvas de *S. purpuratus* (Negri *et al.* 2001; Huang *et al.* 2007; Santiago-González, 2008). Por lo anterior, es posible que estos géneros sean una parte importante en cuanto a la composición y estructura de las comunidades bacterianas asociadas a *S. purpuratus*, involucradas en la generación de compuestos para la selección de sustratos adecuados para el asentamiento y metamorfosis de larvas competentes del erizo morado, y así favorecer su desarrollo y supervivencia en el intermareal rocoso.

Capítulo 3: Efecto del estrés térmico en estadios larvales tardíos en dos especies de erizo *Strongylocentrotus* spp.: Límite de tolerancia térmica, retraso de la metamorfosis y supervivencia post-metamórfica

3.1. Introducción

El erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* y el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* habitan en aguas templadas del Pacífico norte con una distribución que va desde Alaska hasta la isla de Cedros en Baja California, México (Kato y Schroeter, 1985). El ciclo de vida de ambas especies es el mismo, este se caracteriza por presentar una fase planctónica y una fase bentónica. La fase planctónica involucra una sucesión de estadios larvales hasta llegar a la etapa de larva competente; durante esta etapa la larva desarrolla una estructura denominada rudimento larval que le permitirá transformarse en un erizo juvenil mediante el proceso de metamorfosis, el cual es fundamental en su ciclo de vida y requiere de ciertos estímulos ambientales ya sean físicos o químicos para que se lleve a cabo. La fase bentónica involucra el desarrollo de los erizos juveniles en adultos hasta su reproducción.

El erizo rojo (*S. franciscanus*) habita en la zona submareal entre 3 y 50 metros de profundidad en temperaturas promedio de 14 a 18°C, en donde experimenta cambios de temperatura moderados (<10°C), mientras que el erizo morado (*S. purpuratus*) habita en la zona somera del submareal e intermareal rocoso y por lo tanto puede llegar a experimentar cambios de temperatura extremas (>10°C) (Palleiro-Nayar *et al.* 2008). Son organismos ectotérmicos y por lo tanto, su temperatura corporal varía de acuerdo a la temperatura de su entorno. Se sabe que la temperatura es uno de los factores ambientales más importantes, ya que juega un papel central en el desarrollo, la supervivencia y la distribución de los organismos en el ecosistema; la variación de la temperatura en el océano puede ocasionar problemas fisiológicos para los organismos (Helmuth *et al.* 2006; Kuo y Sanford, 2009), principalmente en la zona intermareal en donde puede ser muy rápida y en algunos casos extrema cuando baja la marea.

Diversos estudios han mostrado la importancia de la temperatura durante el desarrollo embrionario y larval, el asentamiento, la metamorfosis y la supervivencia de larvas de diferentes

invertebrados marinos (Putnam *et al.* 2008; Saunders y Metaxas, 2009; Parker *et al.* 2009). Rhaman *et al.* (2009) reportaron que en el erizo de mar *Tripneustes gratilla*, temperaturas por debajo de 22°C y por arriba de 29°C tuvieron efectos en la supervivencia y provocaron anormalidades en el desarrollo embrionario y larval en estadios tempranos a diferentes tiempos de incubación. A pesar de los estudios realizados acerca del efecto de la temperatura durante el desarrollo y la supervivencia en larvas y adultos de invertebrados marinos (Bassim y Sammarco, 2003; Randall y Szmant, 2009), en particular en equinodermos (Johnson y Babcock, 1994, González-Lozano, 2010), poco se sabe acerca de los efectos de temperaturas altas durante el asentamiento y el inicio de la metamorfosis. Chen y Chen (1992) demostraron que larvas de galleta de mar *Arachnoides placenta* mantenidas en un rango de temperaturas entre 28 y 34°C, provocaban una disminución en el porcentaje de metamorfosis.

La metamorfosis es un proceso clave durante el ciclo de vida de muchos invertebrados marinos, es un cambio de la forma de vida larval pelágica a juvenil/adulto en el bentos, y por lo tanto resulta en un cambio morfogenético y de comportamiento. Este proceso es desencadenado por medio de claves ambientales que pueden ser de origen químico o físico asociado al hábitat de los adultos. También se ha reportado que películas bacterianas asociadas a las superficies marinas juegan un papel esencial en la generación de compuestos inductores de la metamorfosis (Lau, y Qian, 2001; Díaz-Pérez, 2006; Chiu *et al.* 2007). Se ha documentado que la respuesta a películas bacterianas es especie-específica es decir, las larvas tienen la capacidad de discriminar y responder a ciertas claves ambientales asociadas a bacterias en los sustratos apropiados para sobrevivir y desarrollarse (Elkin y Marshall, 2007). De esta manera, el incremento de la temperatura durante la metamorfosis, puede tener consecuencias ecológicas desfavorables al momento de la detección de la clave ambiental y en la selección de los sustratos adecuados para desarrollarse (Gebauer *et al.* 2003). Debido a que ambas especies de erizo (*S. franciscanus* y *S. purpuratus*) habitan en ambientes térmicamente diferentes, el objetivo del presente estudio es determinar la tolerancia térmica de ambas especies en estadios larvales tardíos y durante el proceso de la metamorfosis en incrementos de temperaturas como las que se experimentan en su ambiente, así como en temperaturas extremas que lleven al límite a las larvas. Con la finalidad de determinar cuál es el umbral de tolerancia térmica de ambas especies y cómo puede afectar su funcionamiento fisiológico.

El realizar éstos estudios durante las fases larvales tardías y el inicio de la metamorfosis, es debido a que éstas fases de desarrollo son claves durante el ciclo de vida de ambas especies de erizo, ya que representan el cambio de la fase de vida larval pelágica, a la fase de vida bentónica como juvenil y adulto.

3.2.- Metodología

3.2.1. Colecta de organismos y cultivo de larvas

Erizos morados adultos (*S. purpuratus*) fueron colectados de la zona intermareal en Punta Baja (29° 56' 58.29" N, 115° 48' 42.65" W) y Bajamar (32° 00' 51.32" N, 116° 52' 27.23" W). Los erizos rojos (*S. franciscanus*) fueron colectados a 20 metros de profundidad en la Bahía Todos Santos (31°48'06.65"N, 116°46'37.26"W) en Ensenada, Baja California, México. Los erizos fueron transportados en hieleras con un sustrato húmedo al laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), donde fueron mantenidos a temperatura de 15°C en acuarios de 70 litros con flujo continuo de agua de mar hasta su utilización. La obtención de los gametos se realizó de acuerdo al método descrito por Strathmann (1987) aplicando una inyección de 0.5ml de KCl (0.53M) en la cavidad del celoma de los organismos, el cual se ha visto que induce al desove a ciertos grupos de invertebrados, así como también se ha visto que es un buen inductor a la metamorfosis en larvas de erizo.

La producción y mantenimiento de larvas se realizó de acuerdo al método descrito por Carpizo-Ituarte *et al.* (2002). Los óvulos fertilizados se mantuvieron en cubetas de 20 L con agua de mar filtrada (a 1 µm) hasta el estadio larvario de prisma. El desarrollo larval se llevó a cabo en tanques cónicos de 45 litros a una densidad de 3 larvas/ml con aireación continua, y fueron alimentadas diariamente con la microalga *Rhodomonas* sp. (concentración de 17,000 células/ml) hasta que las larvas alcanzaron el estadio de competencia. Se consideraron larvas competentes cuando el rudimento era claramente visible ocupando la región derecha del cuerpo larval y, por la presencia de pies ambulacrales bien diferenciados. El estadio de competencia se alcanzó a los 23 días de desarrollo a partir de la fertilización, a una temperatura controlada entre 15 – 17 °C para el erizo morado y entre 23–25 días a una temperatura controlada entre 12 - 15°C para erizo rojo.

3.2.2 Ensayos experimentales para erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*

3.2.2.1. Límite de tolerancia térmica en estadios tardíos de desarrollo

Larvas precompetentes de ocho brazos de 18 días de edad (**experimento 1a**) y larvas competentes de 23 días de edad (**experimento 1b**) fueron expuestas a diferentes tratamientos experimentales de choque térmico (15, 19, 24, 27 y 31°C). En cada tratamiento se colocaron de 20 a 30 larvas precompetentes de ocho brazos y competentes en 5ml de agua de mar filtrada a 5 y 1µm y pasada por luz ultravioleta (de ahora en adelante se nombrará como AMF) por réplica. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en cajas de seis pozos Falcon. El tratamiento de 15°C fue considerado como control en todos los experimentos debido a que todo el desarrollo larval se mantuvo cercano a esta temperatura. El porcentaje de supervivencia se determinó transcurridas 1, 2, 4, 6 y 24 horas. El objetivo de estos experimentos es determinar el límite de tolerancia térmica en dos de los estadios larvales tardíos.

3.2.2.2. Estrés térmico e inducción a la metamorfosis con biopelículas y KCl

Experimento 2a: Larvas competentes fueron sometidas a estrés térmico durante 30 minutos a diferentes tratamientos experimentales (15, 20, 24, 28 y 31°C). Posterior al estrés, de 20 a 25 larvas se colocaron en 5ml de AMF por réplica y fueron inducidas a la metamorfosis mediante la adición de KCl (100mM durante 15 minutos). La solución de KCl fue sustituida por AMF después de 15 minutos para evitar efectos tóxicos por una exposición prolongada. Se realizaron seis réplicas por tratamiento. En este experimento se pretende determinar el posible efecto del estrés térmico durante el inicio de la metamorfosis con un inductor artificial como el KCl.

Experimento 2b: Se aclimataron larvas competentes durante 30 minutos a 20°C y posteriormente fueron expuestas a estrés térmico durante 30 minutos a diferentes tratamientos experimentales (15, 20, 24, 28 y 32°C). Posterior al estrés, 30 larvas competentes fueron puestas en contacto con biopelículas en 5ml de AMF por réplica para la inducción a la metamorfosis. Las biopelículas se generaron previamente a la realización del experimento, el cual consistió en

sumergir cajas de seis pozos en acuarios con presencia de erizos morados adultos durante 10 días. Cada tratamiento se realizó por triplicado. En este experimento se pretende determinar si la aclimatación previa le confiere una mayor termotolerancia a la larva para iniciar el proceso de la metamorfosis, así como el posible efecto del estrés térmico durante el inicio de la metamorfosis con un inductor natural como las películas bacterianas.

Experimento 2c: De 20 a 25 larvas competentes por pozo, se sometieron a tratamientos de estrés térmico de 15, 20, 24, 26 y 28°C durante cuatro horas. Posterior al estrés, las larvas fueron inducidas a la metamorfosis mediante la adición de KCl (100mM durante 15 minutos). Se realizaron cuatro replicas por tratamiento.

Experimento 2d: Se utilizaron dos lotes de larvas (20 a 25 larvas por pozo), las cuales se sometieron a tratamientos de 15, 20, 24 y 28°C; solamente se utilizó un lote para inducir a las larvas a la metamorfosis, debido a que el otro lote sirvió como control para determinar si la temperatura *per se* estimulaba la metamorfosis. Las larvas fueron inducidas a la metamorfosis mediante KCl (de la misma manera que en el experimento 2a).

En todos los experimentos se incluyó un control positivo que consistió en la inducción a metamorfosis con KCl a 100 mM durante 15 minutos de acuerdo con lo descrito por Carpizo Ituarte *et al.* (2002), y un control negativo en donde las larvas permanecieron durante todo el periodo experimental en AMF esterilizada. El porcentaje de metamorfosis se evaluó a las 12 y 24 horas para los experimentos 2a, 2b y 2d, mientras que para el experimento 2c se evaluó a las seis y 30 horas y posteriormente a los seis días después de la inducción a la metamorfosis; también se evaluó el porcentaje de metamorfosis incompleta, el porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis y el porcentaje de supervivencia de larvas totales para todos los experimentos.

3.2.3 Ensayos experimentales para erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*

3.2.3.1. Límite de tolerancia térmica en estadio competente

Experimento 3a: Larvas competentes de 23 días de edad fueron expuestas a diferentes tratamientos experimentales de choque térmico (12, 20, 23, 26 y 30°C). Se colocaron de 20 a 30

larvas competentes por pozo en 5ml de AMF. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. El tratamiento de 12°C fue considerado como control en todos los experimentos, ya que fue a la temperatura a la que se llevó a cabo el desarrollo larval. El porcentaje de supervivencia se determinó transcurridas 0.5, 1, 2, 4, 6, 13, 29, 53, 80 y 103 horas. El objetivo del experimento es determinar el límite de tolerancia térmica en estadio de larva competente.

3.2.3.2. Efecto del estrés térmico durante la metamorfosis

Experimento 3b: De 20 a 25 larvas competentes por pozos con 5ml de AMF fueron aclimatadas a 20 y 23°C por separado durante 24 horas. Posterior a la aclimatación, las larvas que se aclimataron a 20°C, fueron sometidas a condiciones de estrés térmico de 12, 23, 26 y 29°C; mientras que las larvas que fueron aclimatadas a 23°C se sometieron a 12, 26 y 29°C durante 2 horas. Después del estrés térmico, las larvas fueron inducidas a la metamorfosis mediante la adición de KCl (100mM durante 15 minutos). La solución de KCl fue sustituida por AMF después de 15 minutos para evitar efectos tóxicos por una exposición prolongada. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento. En este experimento se pretende determinar si la aclimatación previa le confiere una mayor termotolerancia a la larva para iniciar el proceso de la metamorfosis, así como el posible efecto del estrés térmico durante el inicio de la metamorfosis con un inductor artificial como el KCl.

En experimentos posteriores, de 20 a 30 larvas competentes por pozo fueron sometidas a tratamientos de estrés térmico durante cuatro y seis horas (**experimento 3c y 3d, respectivamente**) a diferentes tratamientos experimentales (15, 20, 24, 26 y 28°C). Las larvas fueron inducidas a la metamorfosis mediante KCl (de la misma manera que el experimento anterior). Se realizaron cuatro réplicas por tratamiento para el experimento 3c y tres réplicas para el experimento 3d. Con estos experimentos se pretende determinar el posible efecto del estrés térmico durante el inicio de la metamorfosis con un inductor artificial como el KCl en diferentes tiempos de exposición. En los tres experimentos se incluyó un control positivo que consistió en la inducción a metamorfosis con KCl a 100mM durante 15 minutos, y un control negativo en donde las larvas permanecieron en AMF estéril durante todo el periodo experimental.

Se estimó el porcentaje de metamorfosis a las 12 y 24 horas en el experimento 3b, a las 6 horas en el experimento 3c y a las 12 horas y 6 días en el experimento 3d después de la inducción a la metamorfosis. También se evaluó el porcentaje de metamorfosis incompleta, el porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis y el porcentaje de supervivencia de larvas totales utilizadas en los experimentos. En todos los experimentos de inducción a metamorfosis, las larvas se consideraron metamorfoseadas cuando ya no había evidencia del cuerpo larval, la postlarva se desplazaba en el fondo del recipiente y fueron evidentes las espinas juveniles del organismo (Fig. 54a). Se consideró metamorfosis incompleta cuando transcurridas 12 ó 24 horas, todavía era evidente la presencia del cuerpo larval y las espinas juveniles pero sin estar desplegadas en su totalidad (Fig. 54b). El porcentaje de metamorfosis incompleta se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Metamorfosis incompleta} = \frac{\text{Número de larvas que presentan metamorfosis incompleta} \times 100 (\%)}{\text{Número de larvas que iniciaron la metamorfosis}}$$

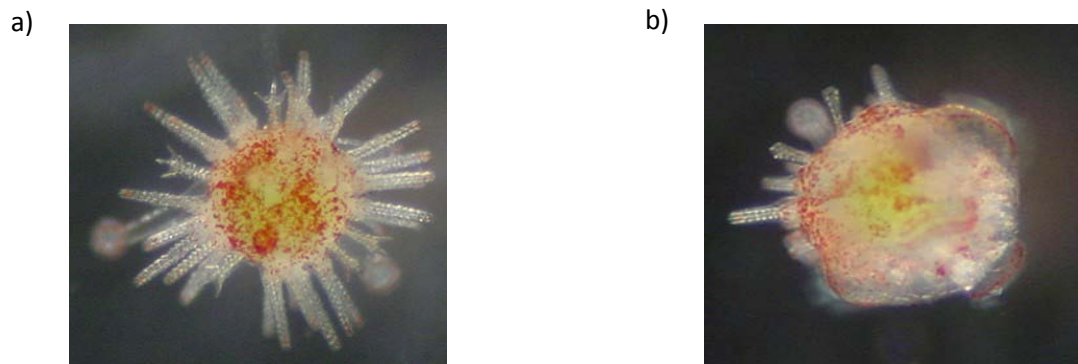


Figura 54. Postlarva de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* recién metamorfoseada (a), y lo que fue considerado como metamorfosis incompleta (b). La fotografía en b es de *S. franciscanus* ya que las características en este nivel del desarrollo resultan comparables para ambas especies de erizo.

3.2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el uso del software SigmaStat 3.5 (SigmaPlot 11). A los datos en porcentaje se les realizó la transformación arcoseno previo a los análisis estadísticos. Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar normalidad y se determinó la homogeneidad de varianzas; los datos que no fueron normales y/o no presentaron homogeneidad de varianzas se les aplicaron pruebas no paramétricas. Los análisis estadísticos se realizaron mediante un análisis de varianza de 1-vía (ANOVA) y un análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis. Se utilizaron las pruebas de Fisher LSD (Least Significant Difference), Student-Newman-Keuls (SNK) y Mann-Witney como pruebas *a posteriori* para establecer diferencias entre los tratamientos. Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0.05$ con un nivel de confianza del 95%.

3.3. Resultados

3.3.1 Ensayos en *Strongylocentrotus purpuratus* (erizo morado)

3.3.1.1. Límite de tolerancia térmica en estadios tardíos de desarrollo

Larvas precompetentes de ocho brazos (experimento 1a) mostraron una supervivencia entre 90 y 100% para los tratamientos de 15, 19 y 23°C durante todo el periodo experimental ($P > 0.05$) (Fig. 55a). Para el tratamiento de 27°C, la supervivencia fue mayor del 90% en las primeras seis horas, posteriormente disminuyó a 83, 65 y 0% (8, 10 y 24 horas, respectivamente). En el tratamiento de 31°C la supervivencia fue del 0% a las dos horas de evaluación (Fig. 55a). El análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis mostró que existieron diferencias significativas entre los tratamientos ($H=111.776$, $gl=39$ (grados de libertad), $P= <0.001$), siendo los de 27 y 31°C los que presentaron diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Fig. 55a).

La supervivencia de larvas en estadio competente (experimento 1b) fue del 100% para los tratamientos de 15, 19 y 23°C durante todo el experimento (Fig. 55b). Para el tratamiento de 27°C, la supervivencia fue entre el 90 y el 100% en las primeras 6 horas, muy similar a los tratamientos con temperaturas inferiores; pero se redujo a 0 % a las 24 horas (Fig. 55b). El tratamiento de 31°C mostró una supervivencia del 100% en las primeras 2 horas y del 0% a las 4 horas (Fig. 55b). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis ($H=68.545$, $gl=24$, $P= <0.001$), en donde los tratamientos de 27 y 31°C fueron diferentes al resto de los tratamientos (Fig. 55b).

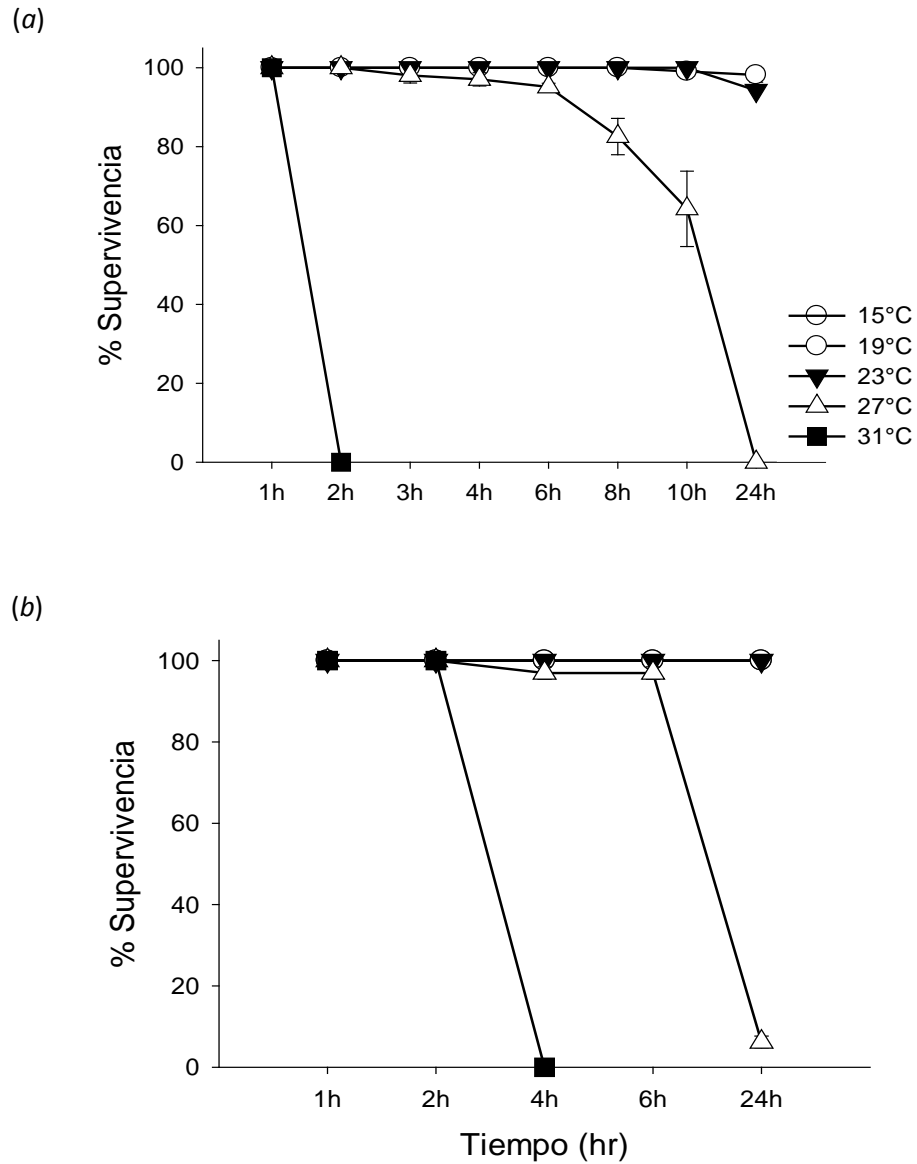


Figura 55.- Efecto de la temperatura en la supervivencia de larvas precompetentes de 8 brazos (a), y larvas competentes (b) de erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* expuestas a diferentes tratamientos de temperatura (15, 19, 23, 27 y 31°C) durante 24 horas. Las líneas verticales indican el error estándar. El tralapo de los símbolos representa el mismo porcentaje de supervivencia.

3.3.1.2 Estrés térmico e inducción a la metamorfosis con KCl y biopelículas (retraso de la metamorfosis)

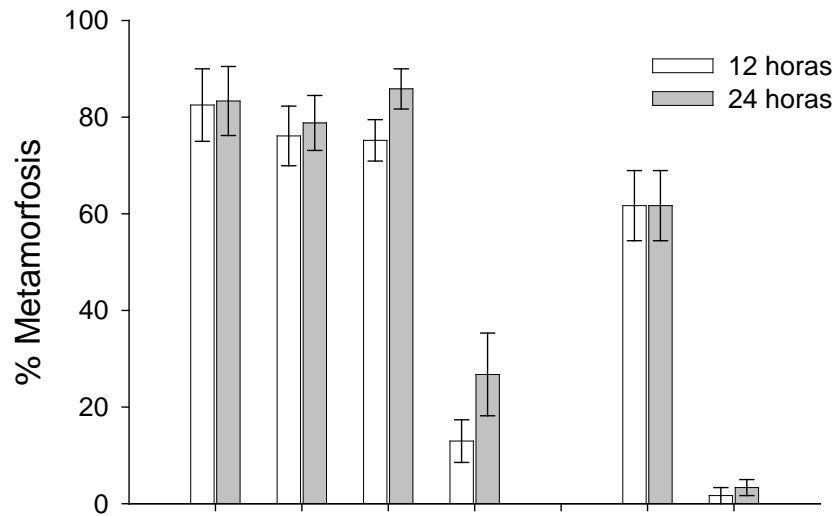
3.3.1.2.1 Experimento 2a: Estrés térmico 30 minutos e inducción a la metamorfosis con KCl

El efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis en *S. purpuratus* fue evaluado a las 12 y 24 horas. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a las 12 (ANOVA, $F= 24.16$, $P= <0.001$) y 24 horas (ANOVA, $F= 16.19$, $P= <0.001$). El porcentaje de larvas que iniciaron la metamorfosis observado para los tratamientos de 15, 20 y 24°C fue muy similar (de 75 al 85%) a las 12 y 24 horas y no se encontraron diferencias significativas entre ellos y tampoco con el control positivo (KCl - 62% de metamorfosis)($LSD P > 0.05$)(Fig. 56a).

Para el tratamiento de 28°C el porcentaje de larvas que iniciaron la metamorfosis fue menor del 25% a las 24 horas, el cual resultó significativamente diferente al resto de los tratamientos ($LSD P < 0.05$), con excepción del control negativo en donde no se encontraron diferencias (AMF)(Fig. 56a). En el tratamiento de 32°C no se observó metamorfosis. El porcentaje de larvas que iniciaron la metamorfosis y presentaron metamorfosis incompleta se evaluó a las 12 y 24 horas, y mediante un análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($H= 11.34$, $gl= 5$, $P= 0.045$). En donde se observó que a mayor temperatura se incrementó el número de larvas con metamorfosis incompleta, siendo el tratamiento de 28°C el que presentó el porcentaje más alto (por arriba del 50%) del total de larvas que iniciaron la metamorfosis (Fig. 56b).

La supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis para los tratamientos de 15, 20, 24°C y KCl fue del 100% al final del experimento; mientras que para el tratamiento de 28°C fue del 80% (Fig. 57a), se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control negativo (Kruskal-Wallis, $H= 21.48$, $gl= 5$, $P= <0.001$). La supervivencia del total de larvas (metamorfoseadas y no metamorfoseadas) fue entre el 94 y 100% para todos los tratamientos con excepción del tratamiento de 32°C, en donde fue del 50% a las 12 horas y de 0% a las 24 horas (Fig. 57b), el cual se encontró significativamente diferente con el resto de los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 31.14$, $gl= 6$, $P= <0.001$).

(a)



(b)

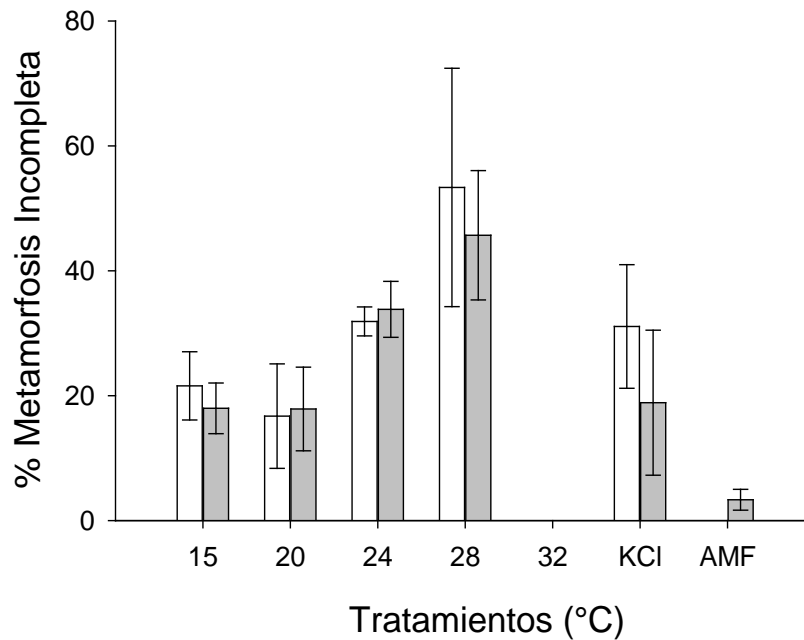


Figura 56.- Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis. (a) Porcentaje de metamorfosis y (b) porcentaje de metamorfosis incompleta de larvas competentes de erizo morado *S. purpuratus*, previamente sometidas a estrés térmico a diferentes temperaturas (15, 20, 24, 28 y 32°C) durante 30 minutos. Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación del porcentaje de metamorfosis a las 12 y 24 horas. Las líneas verticales indican el error estándar.

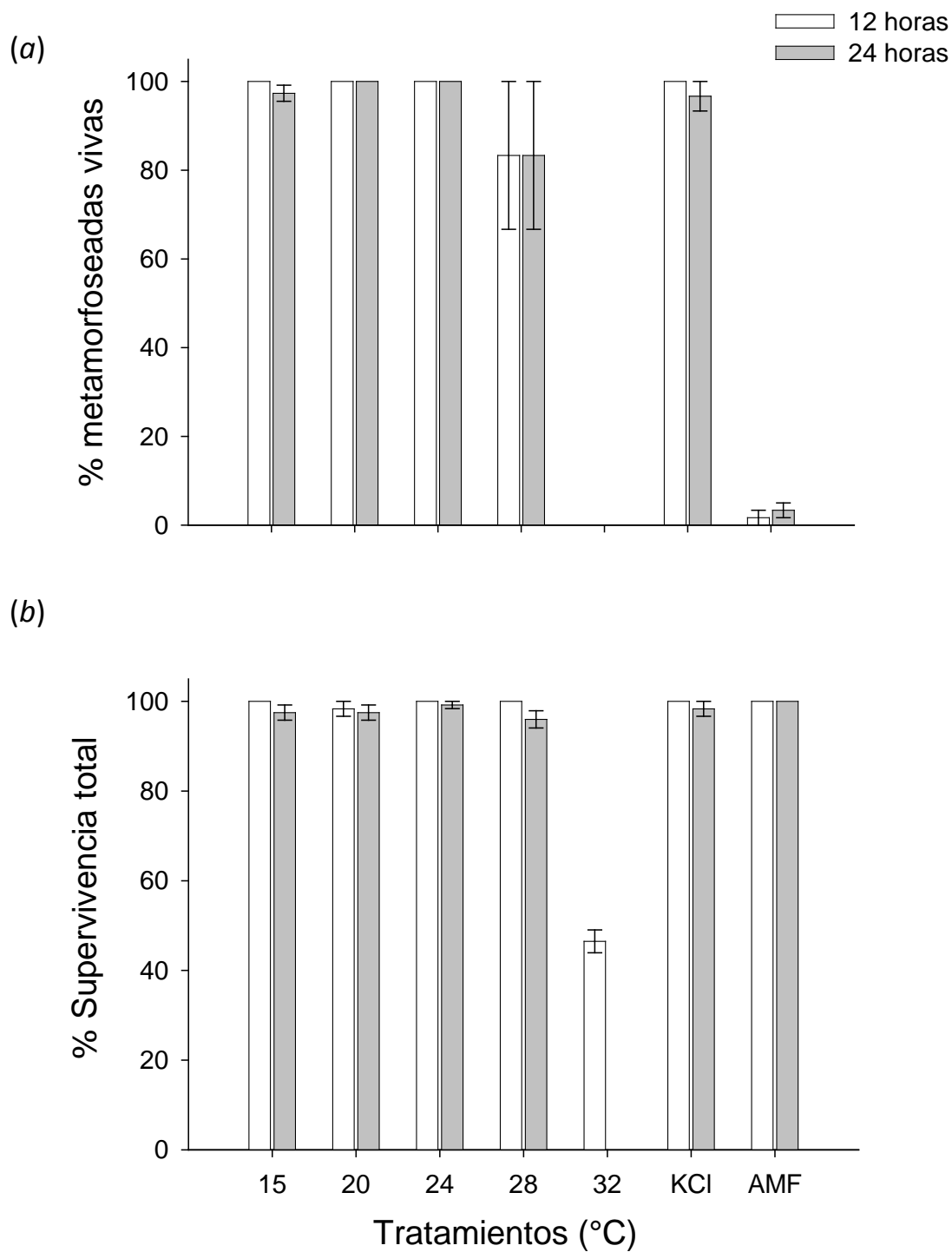


Figura 57.- Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis. (a) Porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis y (b) porcentaje de supervivencia total (metamorfoseadas y no metamorfoseadas) de erizo morado *S. purpuratus*, previamente sometidas a estrés térmico a diferentes temperaturas (15, 20, 24, 28 y 32°C) durante 30 minutos. Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación del porcentaje de metamorfosis a las 12 y 24 horas. Las líneas verticales indican el error estándar.

3.3.1.2.2 Experimento 2b: Aclimatación de larvas, estrés térmico por 30 minutos e inducción a metamorfosis con biopelículas

Mediante un análisis de varianza de 1-vía se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F= 54.7$, $P= <0.001$). El porcentaje de metamorfosis observado para los tratamientos de 15, 20, 24°C y KCl a las 12 y 24 horas fue entre el 66 y el 79% (Fig. 58a); no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($SNK P > 0.05$). Para el tratamiento de 28°C el porcentaje de metamorfosis fue cercano al 50% a las 24 horas, el cual resultó significativamente diferente del resto de los tratamientos ($SNK P < 0.05$). No se observó metamorfosis en el tratamiento de 32°C (Fig. 58a). Para el porcentaje de larvas que presentaron metamorfosis incompleta se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a las 12h (ANOVA, $F= 10.76$, $P= <0.001$) y 24 h (ANOVA, $F= 8.02$, $P= 0.002$).

Las larvas en los tratamientos de 28°C y KCl presentaron un porcentaje de metamorfosis incompleta entre 35 y 56%, los cuales fueron significativamente diferentes a los tratamientos de 15, 20 y 24°C (metamorfosis incompleta entre 19 y 33%) ($LSD P < 0.05$) (Fig. 58b). Al igual que a lo encontrado en el experimento 2a, la tendencia observada fue que a mayor temperatura se incrementó el número de larvas con metamorfosis incompleta. En cuanto a la supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis se encontraron diferencias significativas a las 12h de evaluación (ANOVA, $F= 87.72$, $P= <0.001$) y 24 horas (ANOVA, $F= 40.24$, $P= <0.001$). El porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis para los tratamientos de 15, 20 y 24°C fue entre el 65 y el 75% a las 12 horas (Fig. 59a), los cuales fueron estadísticamente diferentes con el tratamiento de 28°C y el control negativo ($LSD P < 0.05$). A las 24 horas los tratamientos fueron significativamente diferentes con respecto a los dos controles ($LSD P= <0.05$). La supervivencia de larvas totales (metamorfoseadas y no metamorfoseadas) fue entre el 99 y 63% al final del experimento en todos los tratamientos, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (ANOVA 1-vía, $F= 24.61$, $P= <0.001$, $LSD P= <0.05$); con excepción del tratamiento de 32°C en donde la supervivencia fue del 0% en todo el periodo experimental (Fig. 59b).

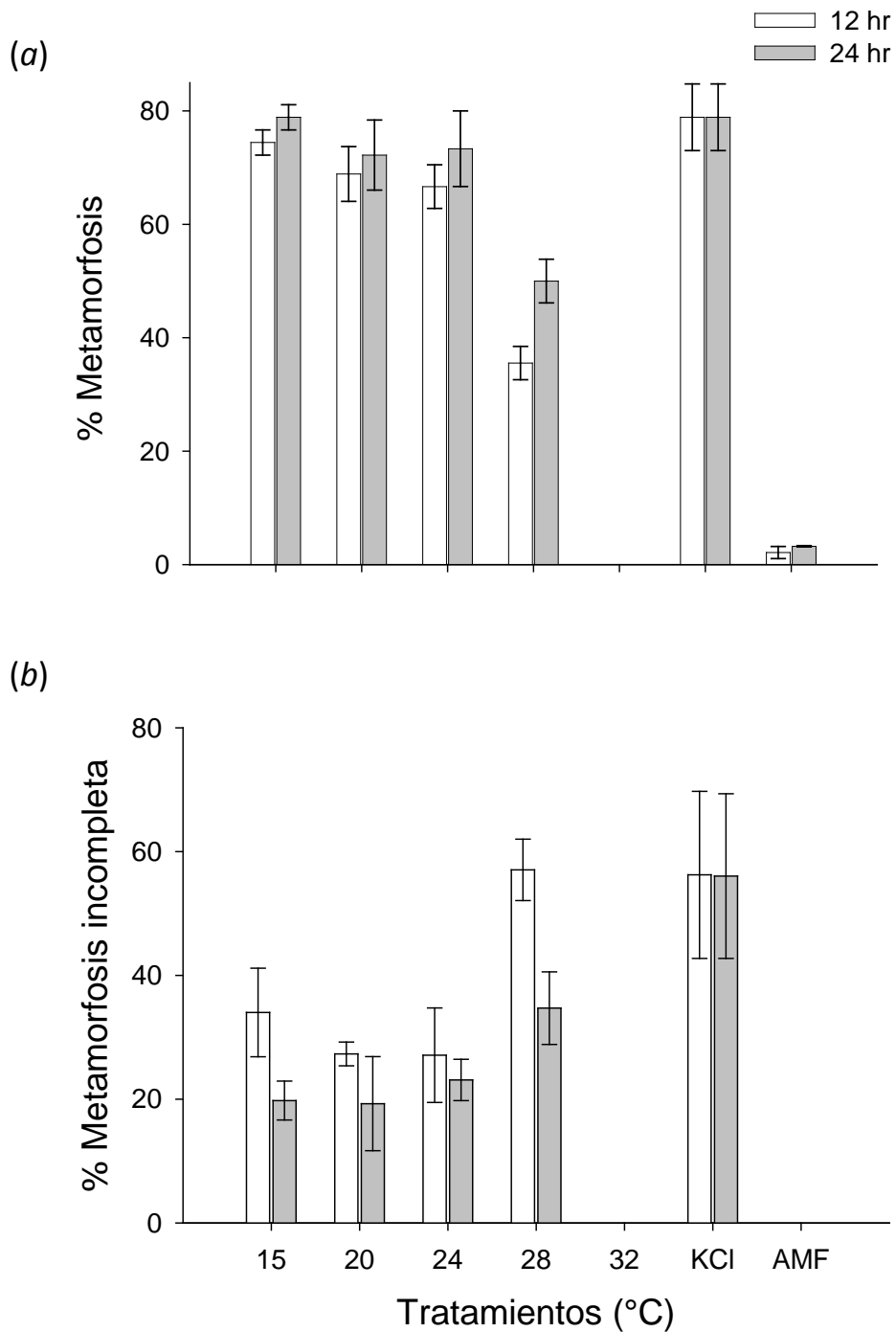


Figura 58. Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis en larvas competentes de erizo morado con aclimatación de 30min a 20°C. (a) Porcentaje de metamorfosis y (b) porcentaje de larvas con metamorfosis incompleta de larvas sometidas a estrés térmico durante 30 minutos e inducidas a la metamorfosis con biopelículas de 10 días de formación. Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación de metamorfosis a las 12 y 24 horas después de la inducción a la metamorfosis. Las líneas verticales indican el error estándar.

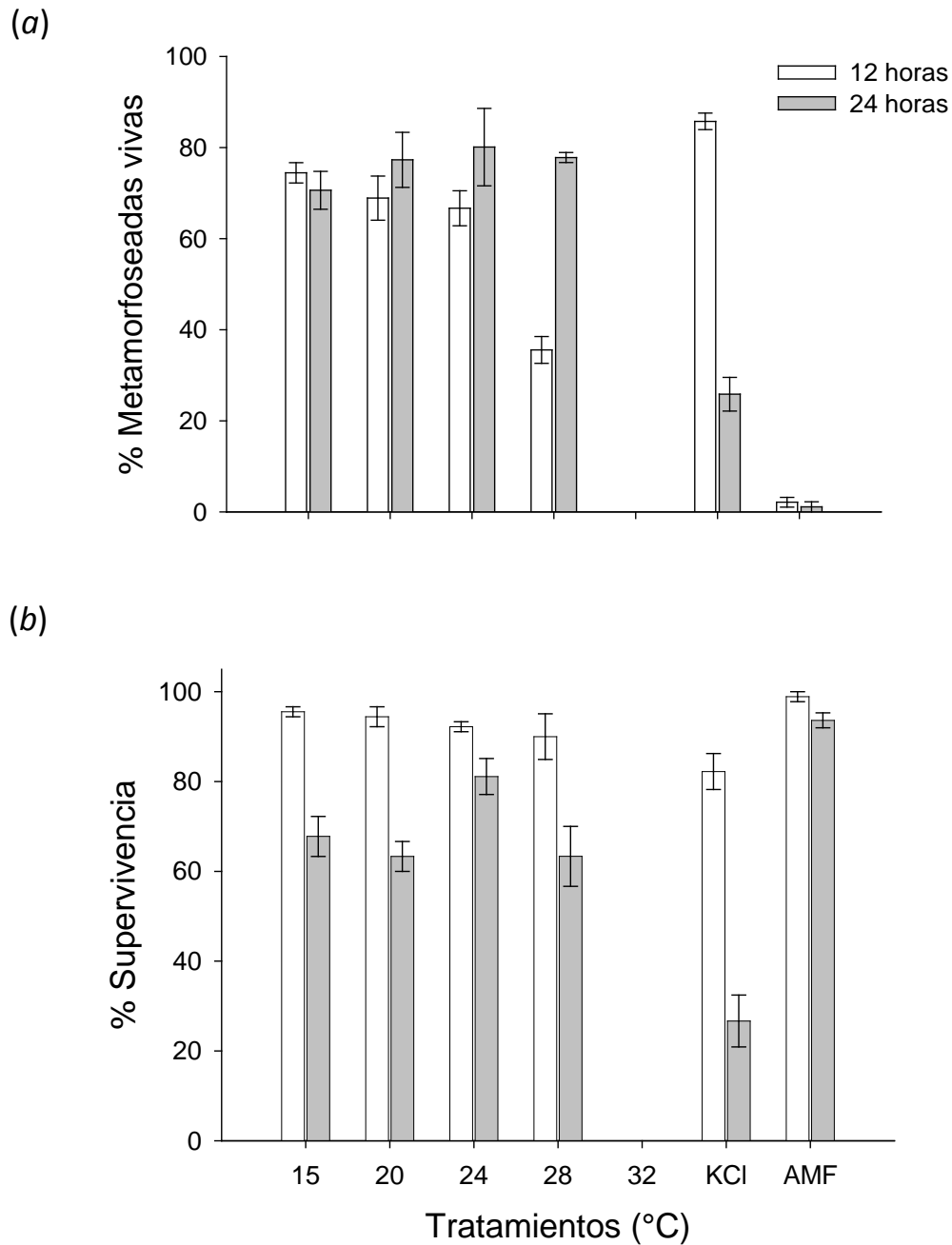


Figura 59.- Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis. (a) porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis y (b) porcentaje de supervivencia total (metamorfoseadas y no metamorfoseadas) de erizo morado *S. purpuratus*, previamente aclimatadas a 20°C durante 30 minutos y posteriormente sometidas a estrés térmico a diferentes temperaturas (15, 20, 24, 28 y 32°C) durante 30 minutos. Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación del porcentaje de metamorfosis a las 12 y 24 horas. Las líneas verticales indican el error estándar.

3.3.1.2.3 Experimento 2c: Estrés térmico durante 4 horas e inducción a metamorfosis con KCl

Se observó una disminución en el porcentaje de larvas que iniciaron la metamorfosis a medida que aumentó la temperatura durante todo el periodo experimental(Fig. 60a), encontrándose diferencias estadísticas significativas a las 6 horas (Kruskal-Wallis, $H= 22.96$, $gl= 6$, $P= <0.001$), a las 30 horas (Kruskal-Wallis, $H= 21.56$, $gl= 6$, $P= 0.001$) y a los 6 días de evaluación (ANOVA 1-vía, $F= 27.82$, $P= <0.001$). Se observó un porcentaje de metamorfosis entre el 70 y el 100% para todos los tratamientos, excepto para el tratamiento de 28°C y AMF (Fig. 60a), los cuales fueron significativamente diferentes con el resto de los tratamientos en todas las evaluaciones ($SNK <0.05$, $LSD <0.05$).

Se observó también que la metamorfosis incompleta fue mayor en las primeras 6 horas de evaluación (65%) en el tratamiento de 26°C (Fig.60b), siendo estadísticamente diferente con el resto de los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 19.73$, $gl= 6$, $P= 0.003$). A las 30 horas se encontró algo muy similar a lo observado a las 6 horas encontrándose diferencias significativas de los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 22.47$, $gl= 6$, $P= <0.001$), con respecto a los tratamientos de 26°C (40%) y AMF (5%)($SNK <0.05$). A los 6 días de evaluación no se encontraron diferencias entre los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 10.79$, $gl= 6$, $P= 0.095$) (Fig.60b).

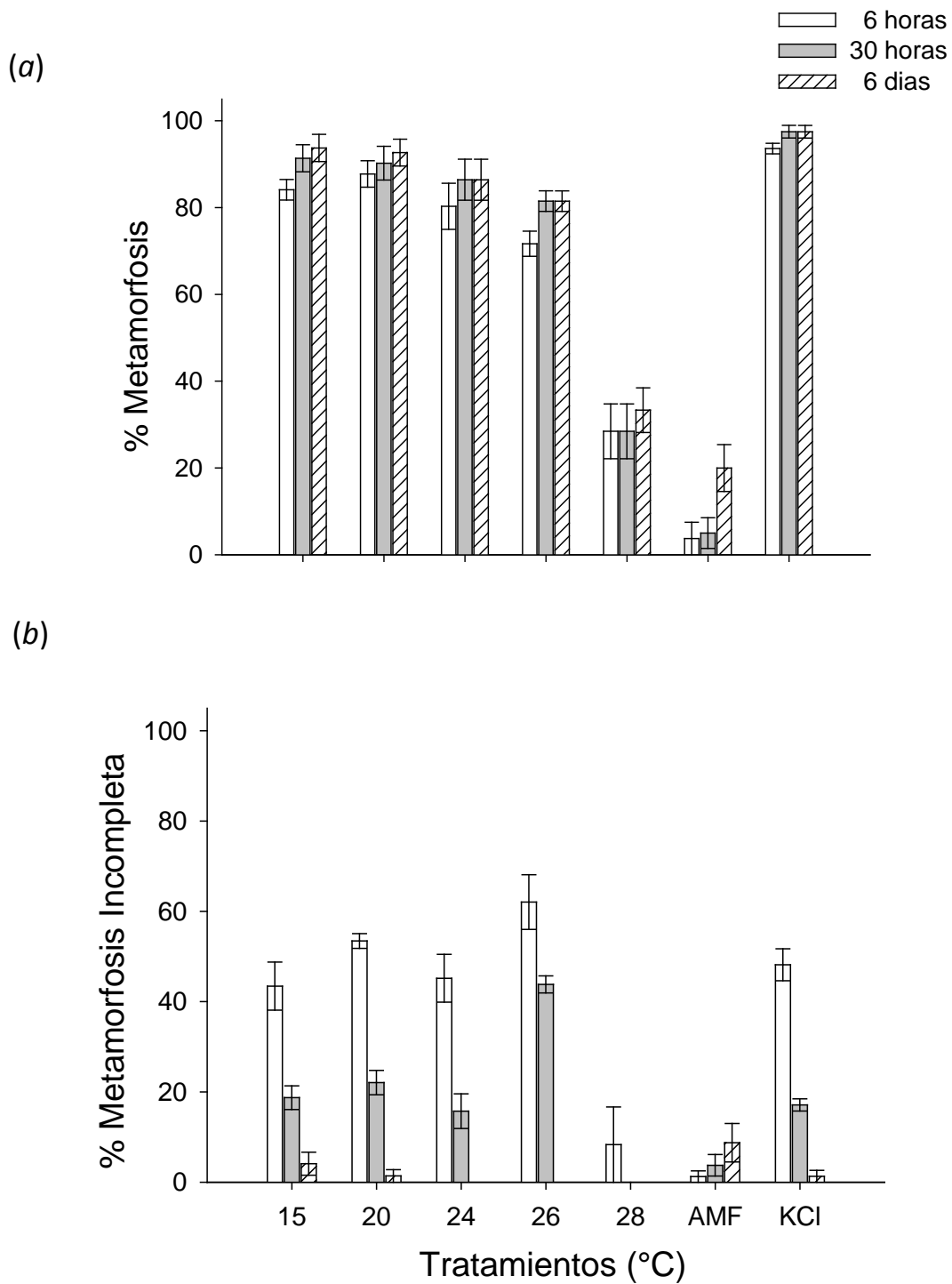


Figura 60. Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis. (a) Porcentaje de metamorfosis y (b) porcentaje de larvas con metamorfosis incompleta de larvas sometidas a estrés térmico durante 4 horas e inducidas a la metamorfosis con KCl (15 minutos). Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación de metamorfosis a las 6 y 30 horas y a los 6 días después de la inducción a la metamorfosis. Las líneas verticales indican el error estándar.

De las larvas que iniciaron la metamorfosis alrededor del 95% continuaron vivas en las primeras 6 y 30 horas de evaluación (Fig.61a), encontrándose diferencias estadísticas significativas con respecto a los tratamientos de 28°C y AMF a las 6 horas (Kruskal-Wallis, $H=26.42$, $gl=6$, $P=0.001$) y a las 30 horas (Kruskal-Wallis, $H=23.31$, $gl=6$, $P=0.001$).

A los 6 días de evaluación los tratamientos de 15, 20, 24°C y KCl tuvieron un porcentaje de supervivencia entre 50 y 70%, siendo significativamente diferentes con los tratamientos de 26, 28°C y AMF (20, 5 y 20%, respectivamente) (Kruskal-Wallis, $H=21.23$, $gl=6$, $P=0.002$) (Fig. 61a). La supervivencia larval total (metamorfoseadas y no metamorfoseadas) fue entre el 80 y 100% (Fig.61b), en las primeras 6 y 30 horas de evaluación con excepción del tratamiento de 28°C el cual fue significativamente diferente del resto de los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H=21.68$, $gl=6$, $P=0.001$, $SNK <0.05$).

A los 6 días de evaluación la supervivencia disminuyó en todos los tratamientos (Fig.61b), teniendo un porcentaje entre el 50 y 70% de supervivencia larval, con excepción de los tratamientos de 26 y 28°C en donde se observó un porcentaje de 20 y 2%, respectivamente (Fig.61b), siendo estadísticamente diferentes con respecto a los demás tratamientos (ANOVA 1-*via*, $F=7.709$, $P=<0.001$, $LSD P=<0.05$).

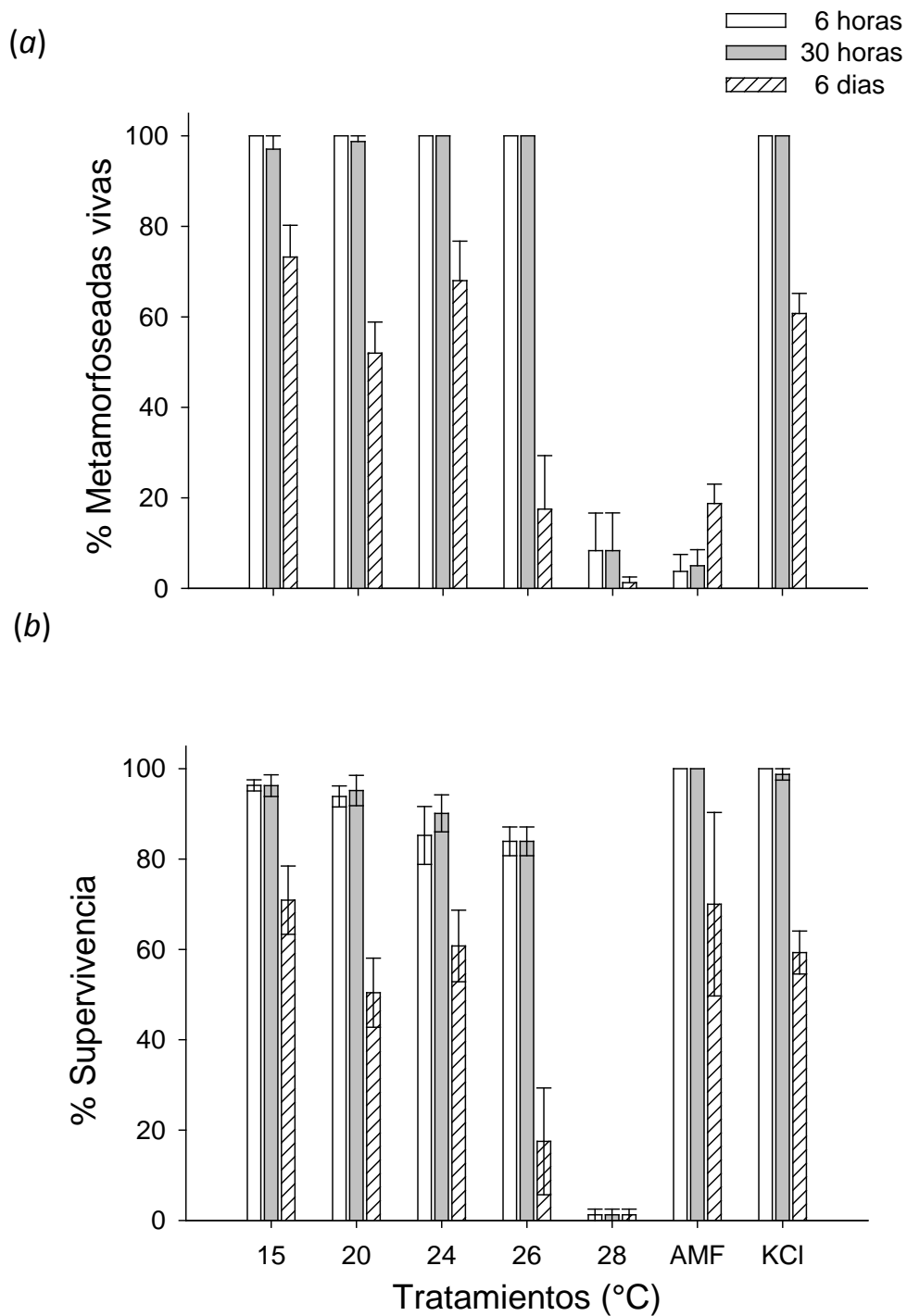
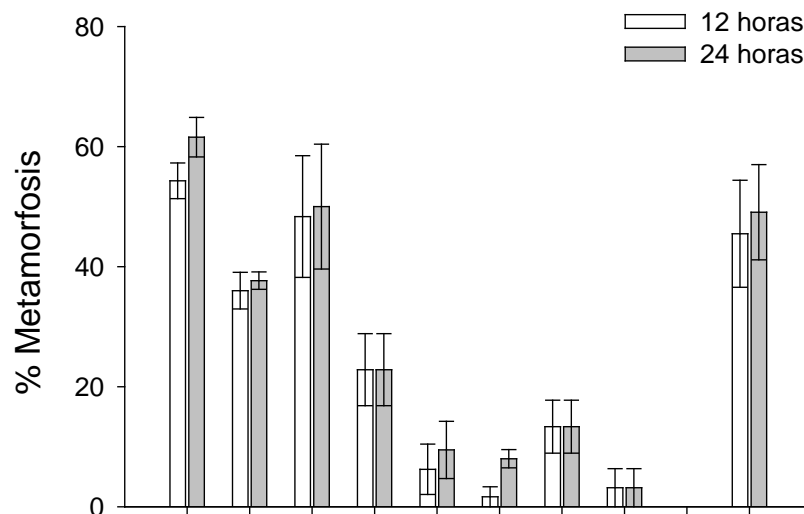


Figura 61.- Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis. (a) Porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis y (b) porcentaje de supervivencia total (metamorfosadas y no metamorfosadas) de erizo morado *S. purpuratus*, previamente sometidas a estrés térmico a diferentes temperaturas (15, 20, 24, 26 y 28°C) durante 4 horas. Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación del porcentaje de metamorfosis a las 6 y 30 horas y a los 6 días. Las líneas verticales indican el error estándar.

3.3.1.2.4 Experimento 2d: Estrés térmico 6 horas e inducción a la metamorfosis con KCl

Durante este experimento se continuó observando que a medida que aumentó la temperatura disminuyó el porcentaje de metamorfosis (Fig.62a), encontrándose diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos a las 12 horas (ANOVA 1-vía, $F=16.38$, $P=<0.001$) y a las 24 horas (Kruskal-Wallis, $H= 25.82$, $gl= 9$, $P= 0.002$). El porcentaje de metamorfosis de los tratamientos de 15, 20 y 24°C (60, 40 y 50%, respectivamente) con inducción de KCl y evaluado a las 24 horas presentó diferencias estadísticas con el tratamiento de 28°C (20% de metamorfosis) ($LSD P= <0.05$); así como con todos los tratamientos que no fueron inducidos a la metamorfosis, en donde se observó un porcentaje de metamorfosis entre el 10 y el 15% (Fig.62a). Para esta especie de erizo fue evidente que la temperatura por sí misma no tuvo un efecto inductor. En cuanto a la metamorfosis incompleta, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos a las 12 horas (Kruskal-Wallis, $H= 8.76$, $gl= 9$, $P= 0.459$) y a las 24 horas (Kruskal-Wallis, $H= 12.79$, $gl= 9$, $P= 0.172$)(Fig.62b), ni tampoco se observó la tendencia en los experimentos anteriores en donde el porcentaje de metamorfosis incompleta se incrementaba a medida que se incrementó la temperatura, esto se debe a que la supervivencia de las larvas que iniciaron la metamorfosis fue de menos del 10% para el tratamiento de 28°C, el cual fue estadísticamente diferente con el resto de los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 25.49$, $gl= 9$, $P= 0.002$)(Fig. 63a). La supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis para el resto de los tratamientos fue entre 60 y 80% para los tratamientos que se indujeron con KCl y entre 30 y 100% para los tratamientos que no se indujeron con KCl al final del experimento (Fig. 63a). Finalmente, la supervivencia total de larvas a las 12 horas de evaluación fue entre el 60 y 80% para los tratamientos con inducción con KCl, mientras que la supervivencia de los tratamientos sin inducción fue entre el 80 y 90% (Fig. 63b), a excepción de los tratamientos de 28°C, para el cual fue del 10% para el tratamiento con inducción con KCl y del 0% para el tratamiento sin inducción, los cuales fueron estadísticamente diferentes con el resto de los tratamientos (ANOVA 1-vía, $F= 16.10$, $P= <0.001$, $SNK= <0.05$). A las 24 horas el porcentaje de supervivencia observado fue entre el 40 y 60% para los tratamientos con inducción con KCl, a excepción del tratamiento de 28°C, el cual fue del 0%. Para los tratamientos sin inducción la supervivencia fue entre el 60 y 85% a excepción del tratamiento de 24°C el cual fue menos del 10% a las 24 horas (Fig. 63b).

(a)



(b)

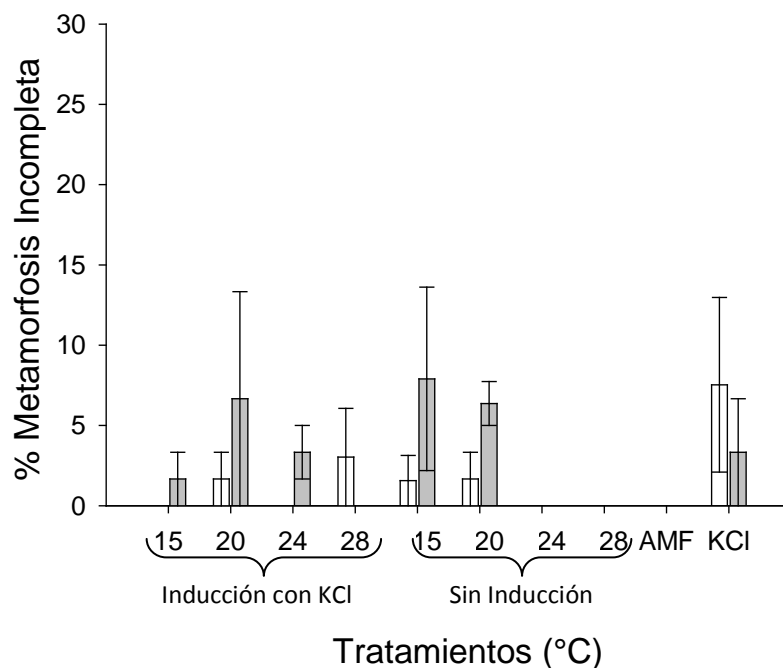


Figura 62. Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis. (a) Porcentaje de metamorfosis y (b) porcentaje de larvas con metamorfosis incompleta de larvas de erizo morado sometidas a estrés térmico durante 6 horas e inducidas a la metamorfosis con KCl (15 minutos). Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación de metamorfosis a las 12 y 24 horas después de la inducción a la metamorfosis. Las líneas verticales indican el error estándar.

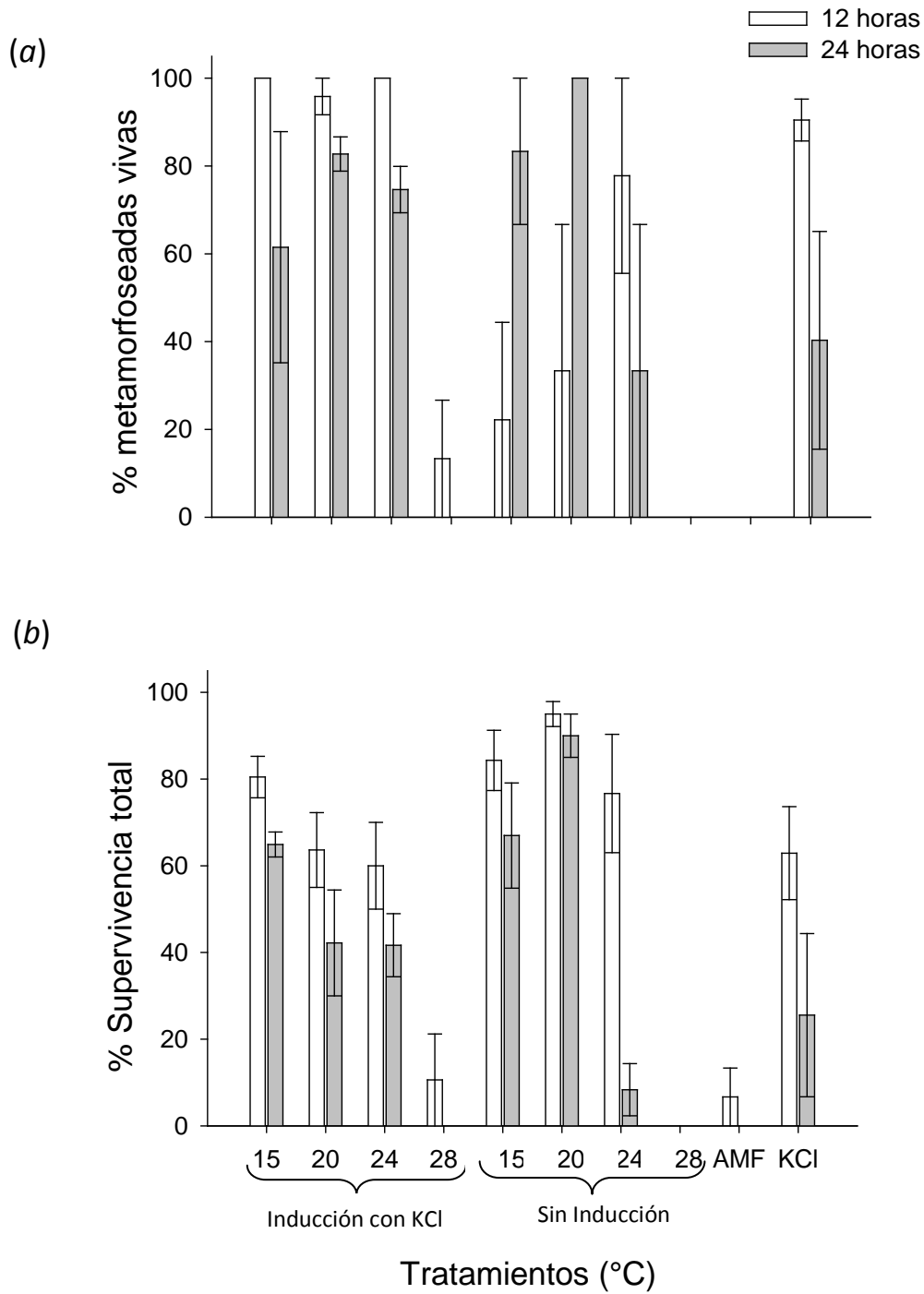


Figura 63.- Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis en larvas de erizo morado *S. purpuratus*. (a) porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis y (b) porcentaje de supervivencia total (metamorfoseadas y no metamorfoseadas) sometidas a estrés térmico a diferentes temperaturas (15, 20, 24 y 28°C) durante 6 horas e inducidas a la metamorfosis con KCl. Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación del porcentaje de metamorfosis a las 12 y 24 horas. Las líneas verticales indican el error estándar.

3.3.2 Ensayos con *Strongylocentrotus franciscanus* (erizo rojo)

3.3.2.1 Experimento 3a: Límite de tolerancia térmica en estadio de larva competente

Se observó que la temperatura óptima en donde se registró el 95% de supervivencia de las larvas competentes de *S. franciscanus*, durante todo el periodo experimental fue entre los 12 y 24°C (Fig. 64); temperaturas por arriba de este rango afectaron la supervivencia de las larvas en un tiempo estimado de alrededor de 53 horas a 27°C, en donde la supervivencia se redujo aproximadamente al 40% y a las 80 horas fue del 0%. A temperaturas extremas de 31°C la supervivencia fue del 0% a las 13 horas (Fig. 64). Se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos a las 4 horas de evaluación (ANOVA 1-vía, $F= 18.73$, $P= <0.001$), siendo el tratamiento de 31°C en el que se presentaron diferencias significativas con el resto de los tratamientos ($SNK= <0.05$) (Fig. 64). También se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a las 53 horas de evaluación (Kruskal-Wallis, $H= 12.16$, $gl= 4$, $P= 0.016$), en donde los valores obtenidos en el tratamiento de 27°C fueron diferentes significativamente con el resto de los tratamientos ($SNK= <0.05$). El resto de las evaluaciones no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos.

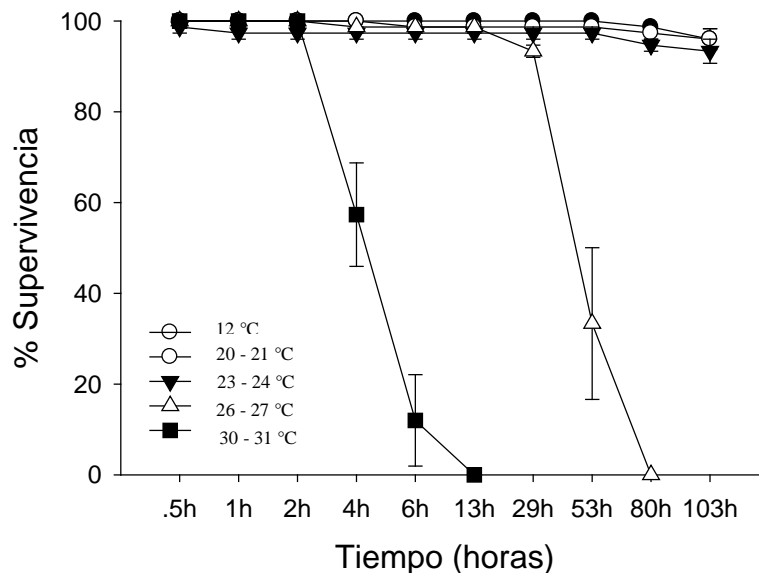


Figura 64. Límite de tolerancia térmica de larvas competentes de erizo rojo (*S. franciscanus*) sujetas a diferentes tratamientos térmicos (12, 21, 24, 27 y 31°C) durante 103 horas de exposición. Las líneas verticales indican el error estándar. El traslape de los símbolos representa el mismo porcentaje de supervivencia.

3.3.3 Estrés térmico e inducción a la metamorfosis con KCl (retraso de la metamorfosis)

3.3.3.1 Experimento 3b: Aclimatación de larvas, estrés térmico por 2 horas e inducción a metamorfosis con KCl

Larvas con aclimatación de 20 y 23°C durante 24 horas mostraron porcentajes de metamorfosis entre el 80 y el 90% para los tratamientos de 12, 20, 23 y 26°C (Fig. 65a), los cuales fueron estadísticamente diferentes con el tratamiento de 29°C con aclimatación a 20°C, en donde se observó un porcentaje del 30% a las 6 horas (ANOVA 1-via, $F= 34.06$, $P= <0.001$, $LSD P= <0.05$) y del 55% a las 20 horas, el cual también fue estadísticamente diferente con el resto de los tratamientos (ANOVA 1-via, $F= 31.56$, $P= <0.001$, $LSD P= <0.05$)(Fig. 65a).

En el tratamiento de 29°C con aclimatación de 23°C no se observó metamorfosis durante todo el periodo experimental debido a que la supervivencia para este tratamiento fue del 3% a las 6 horas y del 0% a las 20 horas de evaluación (Fig.65b). No se observó una tendencia de incremento de larvas con metamorfosis incompleta a medida que aumentaba la temperatura, los valores fueron entre 1 y 5% a las 6 y 20 horas de evaluación para todos los tratamientos (Fig. 65b), a excepción del tratamiento de 29°C con aclimatación de 20°C, en donde se observó un porcentaje de metamorfosis incompleta del 75% (ANOVA 1-via, $F= 8.39$, $P= <0.001$, $LSD P= <0.05$) a las 6 horas y del 38% (ANOVA 1-via, $F= 6.81$, $P= <0.001$, $LSD P= <0.05$) a las 20 horas de evaluación (Fig. 65b).

La supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis fue entre el 90 y el 100% en todos los tratamientos a las 6 horas de evaluación (Fig. 66a), encontrándose diferencias estadísticas con el tratamiento de 12°C (Kruskal-Wallis, $H= 14.60$, $gl= 7$, $P= 0.041$). A las 20 horas de evaluación la supervivencia de las postlarvas fue del 100% (Fig.66a) y no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 0.00$, $gl= 7$, $P= 1.00$). Al final del experimento, la supervivencia larval total (metamorfoseadas y no metamorfoseadas) estuvo cercana al 100% a las 6 y 20 horas de evaluación para todos los tratamientos a excepción del tratamiento de 29°C con aclimatación de 23°C, mencionado anteriormente, en el cual fue del 3% a las 6 horas y 0% a las 20 horas (Fig. 66b).

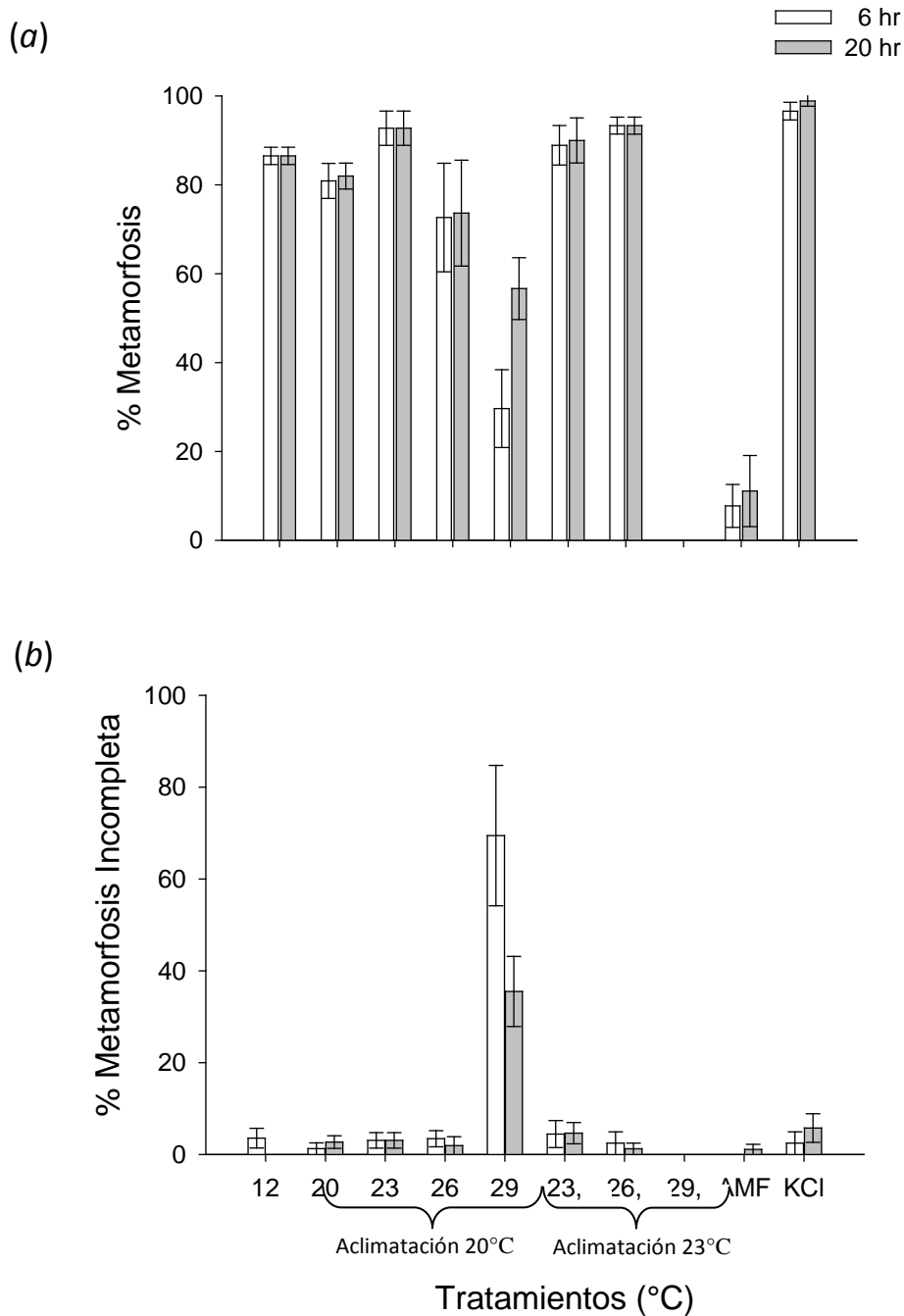


Figura 65. Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis en larvas competentes de erizo rojo *S. franciscanus* con aclimatación de 24 horas a 20 y 23°C por separado. (a) porcentaje de larvas que iniciaron la metamorfosis y (b) porcentaje de larvas con metamorfosis incompleta de larvas sometidas a estrés térmico durante 2 horas e inducidas a la metamorfosis con KCl (15 minutos). Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación de metamorfosis a las 6 y 20 horas después de la inducción a la metamorfosis. Las líneas verticales indican el error estándar.

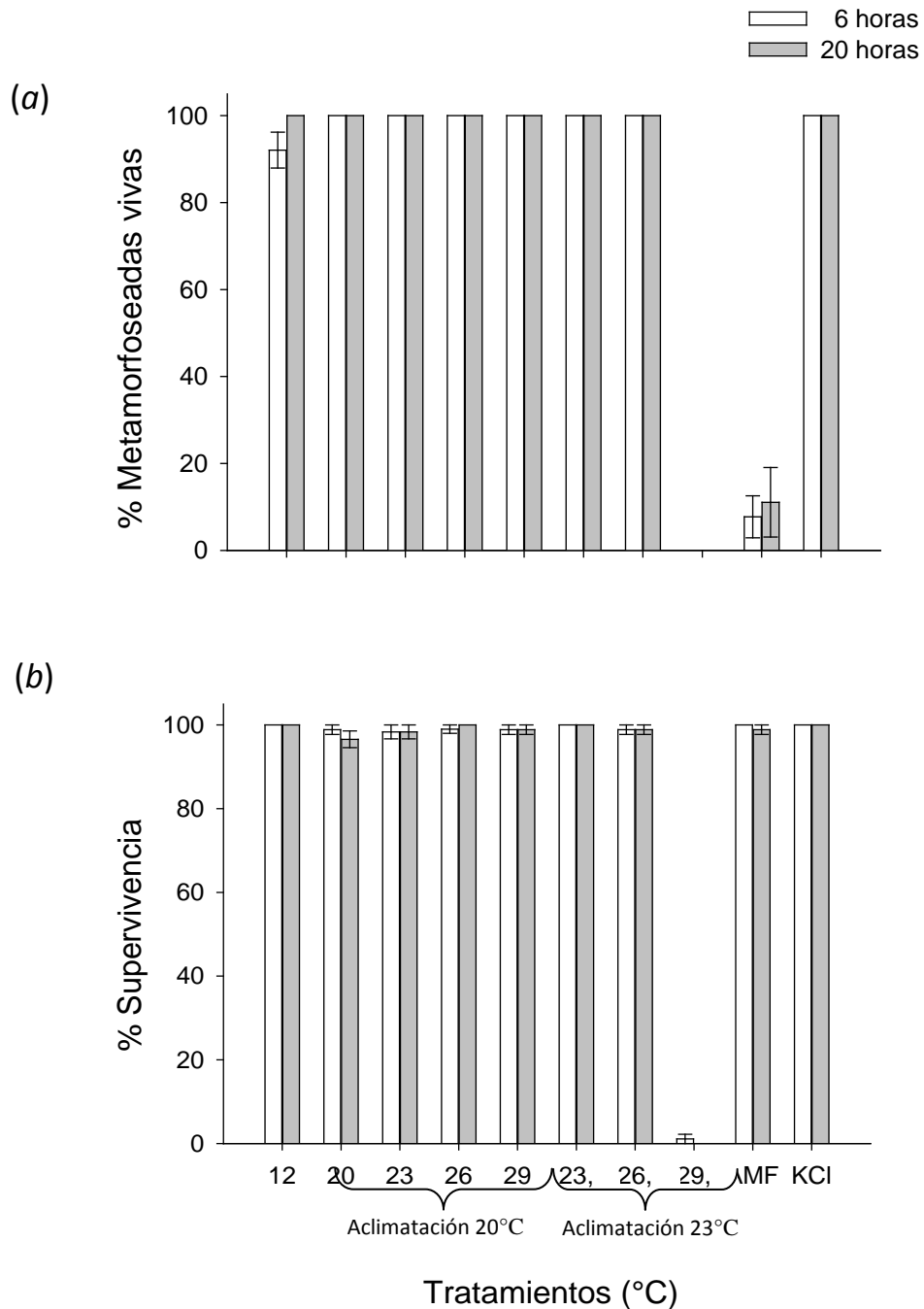


Figura 66.- Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis en larvas de erizo rojo *S. franciscanus*. (a) porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis y (b) porcentaje de supervivencia total (metamorfoseadas y no metamorfoseadas), previamente sometidas a estrés térmico a diferentes tratamientos experimentales durante 2 horas con aclimatación previa de 20 y 23°C durante 24 horas. Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación del porcentaje de metamorfosis a las 6 y 20 horas. Las líneas verticales indican el error estándar.

3.3.3.2 Experimento 3c: Estrés térmico 3 horas e inducción a metamorfosis con KCl

Larvas competentes de erizo rojo sometidas a estrés durante 3 horas presentaron un porcentaje de metamorfosis entre el 83 y 100% para todos los tratamientos, a excepción del control negativo (AMF) el cual fue del 0% a las 6 horas de evaluación (Fig. 67a). El tratamiento de 28°C fue el que presentó el porcentaje más bajo (85%) y fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 19.59$, $gl= 6$ $P= 0.003$) con excepción del tratamiento de 26°C, con el que no se encontraron diferencias estadísticas (Mann-Whitney >0.05). En las larvas que iniciaron la metamorfosis se observó el patrón característico observado en erizo morado, en donde a medida que aumentó la temperatura se incrementó el número de larvas que presentaron metamorfosis incompleta (Fig. 67b). Hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (ANOVA 1-vía, $F= 55.33$, $P= <0.001$), el tratamiento de 28°C presentó el porcentaje más alto de metamorfosis incompleta (85%), el cual fue significativamente diferente al resto de los tratamientos ($LSD P= <0.05$).

En el resto de los tratamientos se observaron porcentajes entre 3 y 35%, siendo el tratamiento de 26°C el que presentó el segundo valor más alto y por lo tanto, estadísticamente diferente al resto de los tratamientos ($LSD P= <0.05$) (Fig. 67a). El porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis fue del 100% en todos los tratamientos y sólo se encontraron diferencias estadísticas con respecto al control negativo (Kruskal-Wallis, $H= 27$, $gl= 6$, $P= <0.001$, Mann-Whitney, $P= <0.05$) (Fig. 68a). La supervivencia total al final del experimento en todos los tratamientos fue de entre el 95 y 100% (Fig. 68b) y no se encontraron diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $H= 4.32$, $gl= 6$, $P= >0.632$).

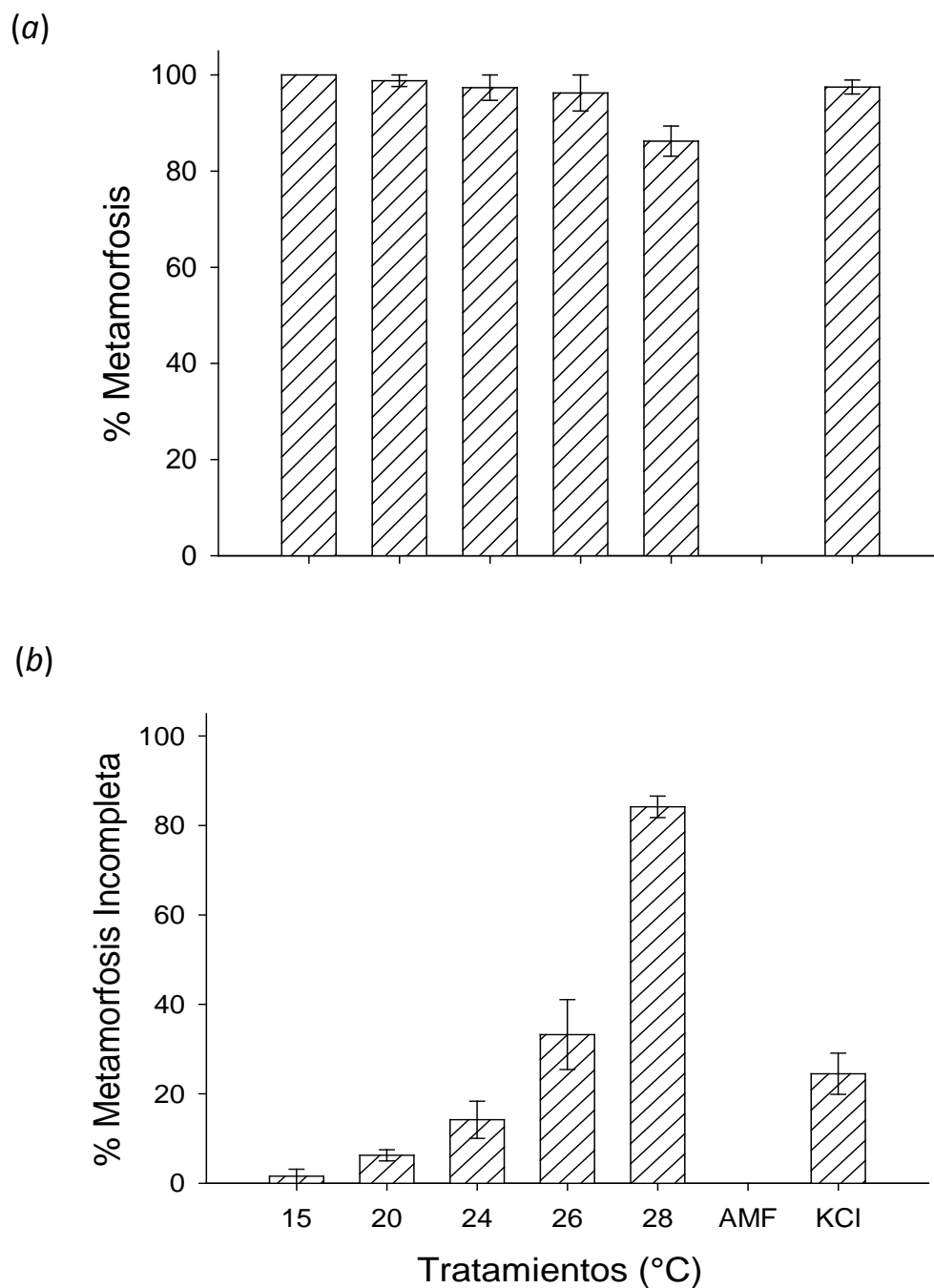


Figura 67. Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis de larvas competentes de erizo rojo *S. franciscanus*. (a) porcentaje de larvas que iniciaron la metamorfosis y (b) porcentaje de larvas con metamorfosis incompleta, en larvas sometidas a estrés térmico durante 3 horas a diferentes tratamientos experimentales e inducidas a la metamorfosis con KCl (15 minutos). Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación de metamorfosis a las 6 horas después de la inducción a la metamorfosis. Las líneas verticales indican el error estándar.

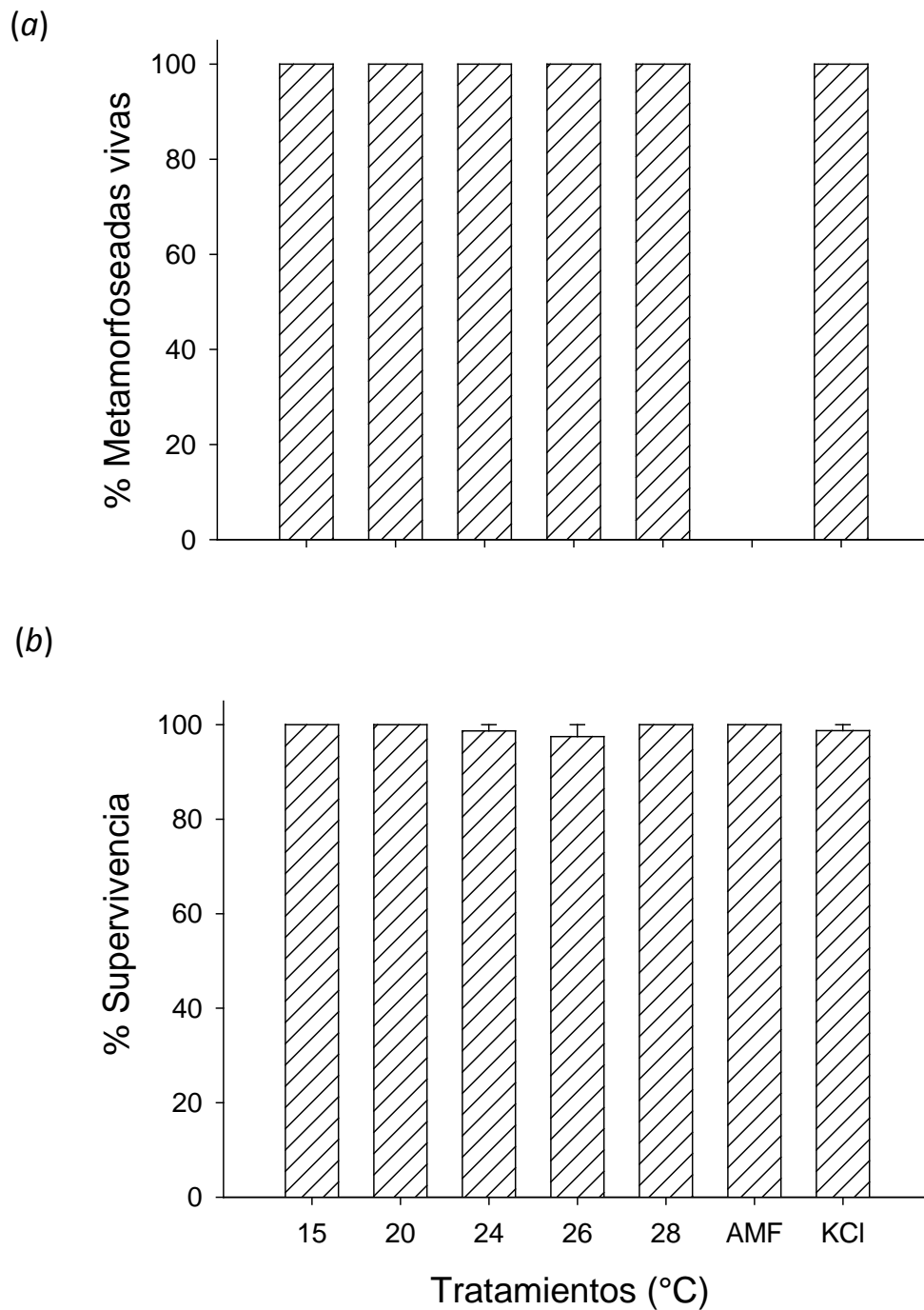


Figura 68.- Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis de larvas competentes de erizo rojo *S. franciscanus*. (a) porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis y (b) porcentaje de supervivencia total (metamorfoseadas y no metamorfoseadas) de larvas previamente sometidas a estrés térmico a diferentes tratamientos experimentales durante 3 horas. Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación del porcentaje de metamorfosis a las 6 horas. Las líneas verticales indican el error estándar.

3.3.3.3 Experimento 3d: Estrés térmico 6 horas e inducción a metamorfosis con KCl

Las larvas de erizo rojo que iniciaron la metamorfosis a las 12 horas de evaluación fue entre 90 y 98% para los tratamientos de 15, 20, 24, 26°C y KCl, mientras que con el tratamiento de 28°C presentaron el valor más bajo (65%) (Fig. 69a), siendo estadísticamente diferente con el resto de los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 20.74$, $gl= 6$, $P= 0.002$, $SNK P= <0.05$). No se encontró incrementos en el porcentaje de metamorfosis a los 6 días de evaluación (Fig. 69a).

En las larvas que presentaron metamorfosis incompleta se observó un patrón muy similar a lo observado en el experimento anterior (experimento 3c), en donde el porcentaje de larvas con metamorfosis incompleta se incrementó conforme la temperatura fue mayor en los tratamientos experimentales. A las 12 horas fue muy clara la diferencia entre los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 23.06$, $gl= 6$, $P= <0.001$), en donde el tratamiento de 28°C presentó el mayor porcentaje observado (85%) siendo estadísticamente diferente con el resto de los tratamientos ($SNK <0.05$)(Fig. 69b). A los 6 días se observó que la mayoría de las larvas de todos los tratamientos completaron la metamorfosis, registrándose valores entre 10 y 15% (Fig.69b) (ANOVA 1-vía, $F= 1.79$, $P= 0.148$).

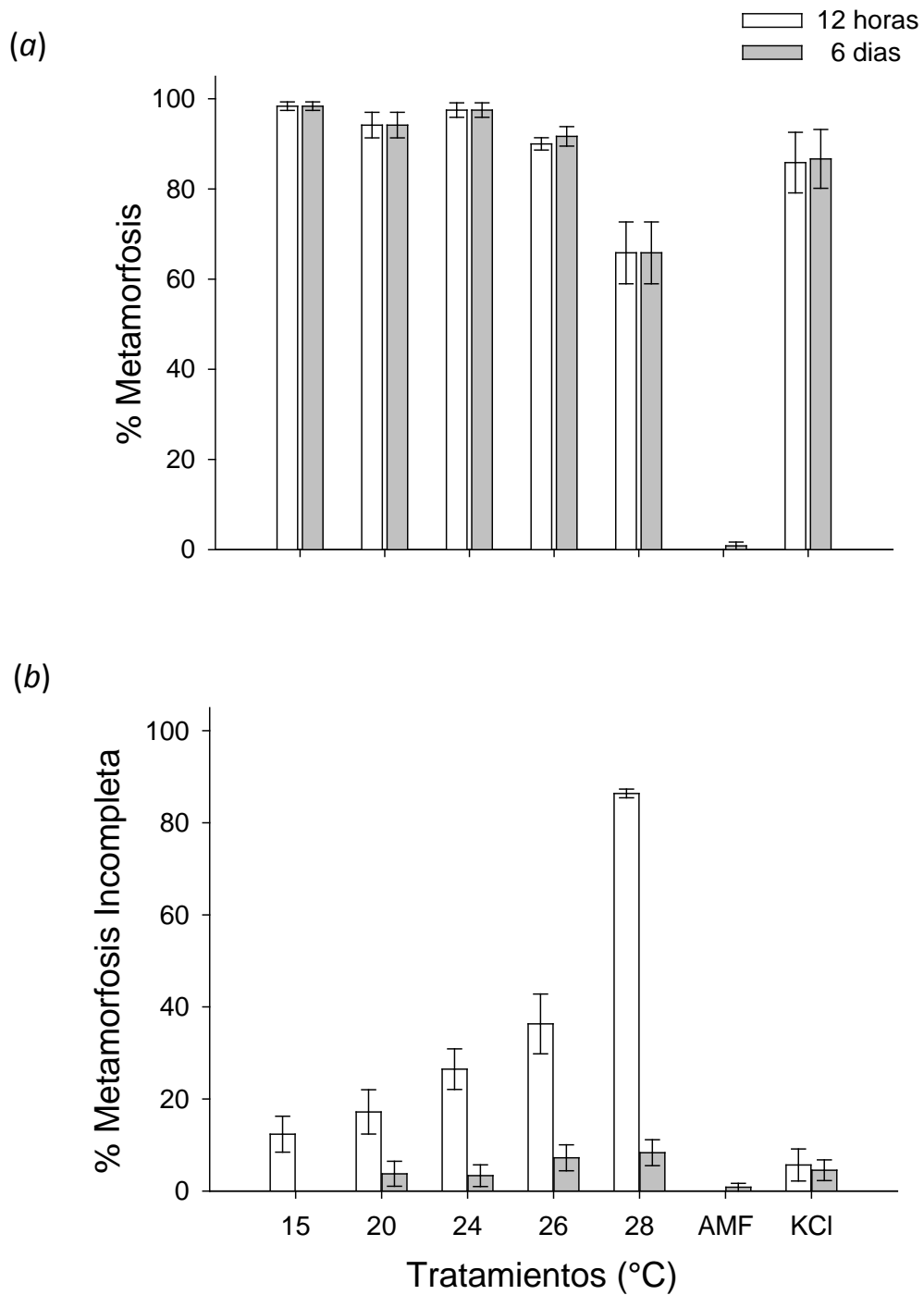


Figura 69. Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis de larvas competentes de erizo rojo *S. franciscanus*. (a) porcentaje de larvas que iniciaron la metamorfosis y (b) porcentaje de larvas que presentaron metamorfosis incompleta, sometidas a estrés térmico durante 6 horas en diferentes tratamientos experimentales e inducidas a la metamorfosis con KCl (15 minutos). Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación de metamorfosis a las 12 horas y a los 6 días después de la inducción a la metamorfosis. Las líneas verticales indican el error estándar.

La supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis (postlarvas) a las 12 horas después de la inducción, fue del 100% para los tratamientos de 15, 20, 24, 26°C y KCl (Fig. 70a), mientras que para el tratamiento de 28°C fue del 70%, siendo éste, estadísticamente diferente con el resto de los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 24.17$, $gl= 6$, $P= <0.001$, $SNK P= <0.05$). A los 6 días de evaluación los tratamientos de 20, 24 y 26°C registraron un porcentaje entre 85 y 90%, en el tratamiento de 15°C se observó un porcentaje del 55%, mientras que para el tratamiento de 28°C fue del 25% (Fig.70a). Se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 20$, $gl= 6$, $P= 0.003$).

La supervivencia total de larvas (metamorfoseadas y no metamorfoseadas) a las 12 horas de evaluación fue de entre el 90 y el 100% para la mayoría de los tratamientos, con excepción del tratamiento de 28°C, el cual fue alrededor del 50% y fue estadísticamente diferente con el resto de los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 21.33$, $gl= 6$, $P= 0.002$, $SNK P= <0.05$). La evaluación a los 6 días posteriores a la metamorfosis se registró valores de supervivencia entre el 75 y 85% para los tratamientos de 20, 24, 26°C, KCl y AMF, del 55% para el tratamiento de 15°C y del 20% para el tratamiento de 28°C (Fig. 70b), siendo este último estadísticamente significativo con el resto de los tratamientos (Kruskal-Wallis, $H= 13.57$, $gl= 6$, $P= 0.035$, $SNK P= <0.05$).

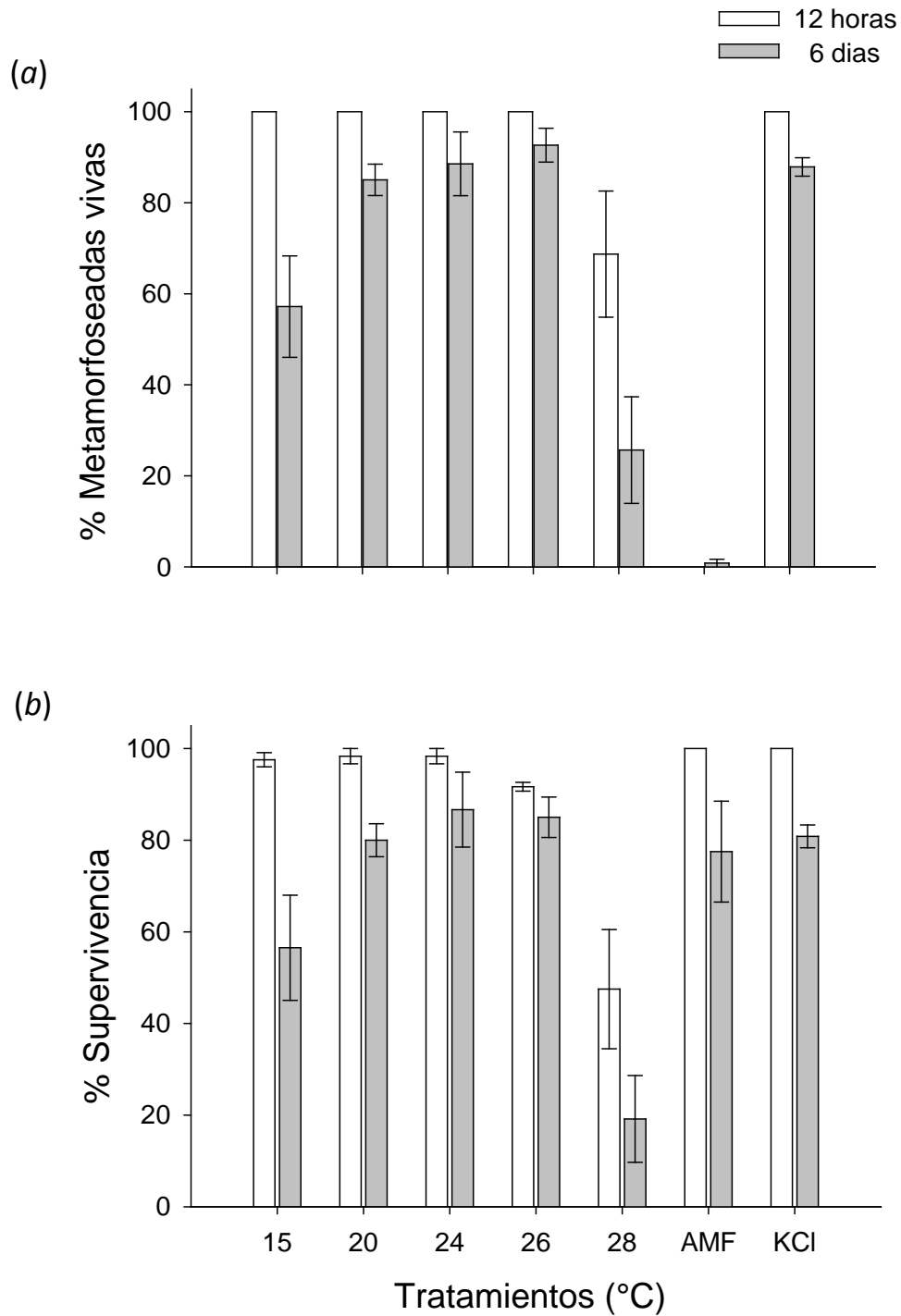


Figura 70.- Efecto del estrés térmico en el inicio de la metamorfosis de larvas competentes de erizo rojo *S. franciscanus*. (a) porcentaje de supervivencia de larvas que iniciaron la metamorfosis y (b) porcentaje de supervivencia total (metamorfoseadas y no metamorfoseadas) de larvas previamente sometidas a estrés térmico a diferentes tratamientos experimentales durante 6 horas. Se incluyó un control positivo (KCl) y control negativo (AMF). Evaluación del porcentaje de metamorfosis a las 12 horas y a los 6 días después de la inducción a metamorfosis. Las líneas verticales indican el error estándar.

3.4 Discusión

3.4.1 LÍMITES DE TOLERANCIA TÉRMICA

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar los límites de tolerancia térmica en dos especies congéneras de erizo de mar que habitan en la costa de Baja California. De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que en condiciones de laboratorio tanto el erizo morado (*S. purpuratus*), como el erizo rojo (*S. franciscanus*) tienen una termotolerancia alta en periodos de tiempo cortos (24 y 103 hrs) en estadios larvales tardíos (ocho brazos y competente), por lo que presentan una buena capacidad de soportar cambios significativos de temperatura. Así mismo, se determinó que el límite de tolerancia térmica en ambas especies fue de 27°C, ya que a partir de esta temperatura se observó una disminución en la supervivencia larval a medida que transcurría el tiempo (Figs. 55b y 64).

Estudios anteriores han documentado esta alta termotolerancia para el proceso de fertilización en *Heliocidaris erythrogramma* y durante el desarrollo embrionario y larval en *S. purpuratus* (Farmamfarmaian y Giese, 1963; Byrne *et al.* 2009). Hammond y Hofmann (2010), mediante estudios de termotolerancia y perfiles de expresión de proteínas de choque térmico (hsp's, "heat shock proteins"), determinaron que la tolerancia al estrés térmico a incrementos de temperatura en dos estadios de desarrollo tempranos (gástrula y larva pluteus 4-brazos) fue de manera similar, encontrando una mortalidad del 100% con 1 hora de exposición a 32°C y un perfil de expresión de hsp's muy similar para ambos estadios; por lo que mencionan que es probable que exista una tolerancia de temperatura universal durante el desarrollo larval como mecanismo para su supervivencia en su etapa plantónica, y por lo tanto, es posible que sea especie-específica. En relación con lo mencionado anteriormente, los resultados obtenidos en estadios tardíos de *S. purpuratus* mostraron una termotolerancia muy similar a lo reportado por Hammond y Hofmann (2010), en donde se observó una mortalidad del 100% a 31°C a las 2 horas de exposición en larvas pluteus de 8-brazos y a las 4 horas de exposición en larvas competentes. De esta manera, es posible que exista una tolerancia de temperatura universal para *S. purpuratus* durante el desarrollo larval, con un incremento de tolerancia en estadio

competente, el cual le permita llevar a cabo el asentamiento y la metamorfosis con éxito. Estudios a nivel molecular en estadios de desarrollo tardíos en *S. purpuratus* serán necesarios para determinar si los perfiles de expresión de hsp's son equiparables a lo reportado en estadios tempranos. Así también, estudios de termotolerancia y perfiles de expresión de hsp's en estadios larvales en erizo rojo (*S. franciscanus*) serán necesarios para determinar si la tolerancia de temperatura se comporta de manera similar durante todo el desarrollo larval en esta especie congénera.

Por otro lado, es de llamar la atención que a pesar de que ambas especies tienen el mismo límite de tolerancia térmica (27°C), las larvas de erizo rojo mostraron un mejor desempeño fisiológico en su respuesta al estrés térmico y por lo tanto, una mayor termotolerancia (80h a 27°C y 13h a 31°C) a diferencia del erizo morado (24h a 27°C y 4h a 31°C) (Fig. 55b y 64b). Lo anterior es muy interesante ya que el erizo rojo habita en ambientes moderadamente variables de temperatura (<10°C) en el submareal, y por lo tanto, se consideraba que al no experimentar grandes variaciones de temperaturas en su hábitat, este sería más sensible a cambios bruscos o extremos de temperatura, a diferencia del erizo morado que habita principalmente en la zona intermareal, que es un ambiente extremadamente variable y puede llegar a presentar temperaturas extremas en condiciones de marea baja (Helmuth, 2002; Helmuth *et al.* 2006); como en Punta Baja, en donde se registró temperaturas alrededor de los 25°C y en algunos casos aislados hasta 30°C en intervalos de marea, para el periodo de diciembre del 2008 a abril del 2009 (Fig. 71), siendo temporada de reproducción para ambas especies y por lo tanto un incremento en eventos de asentamiento, metamorfosis y reclutamiento.

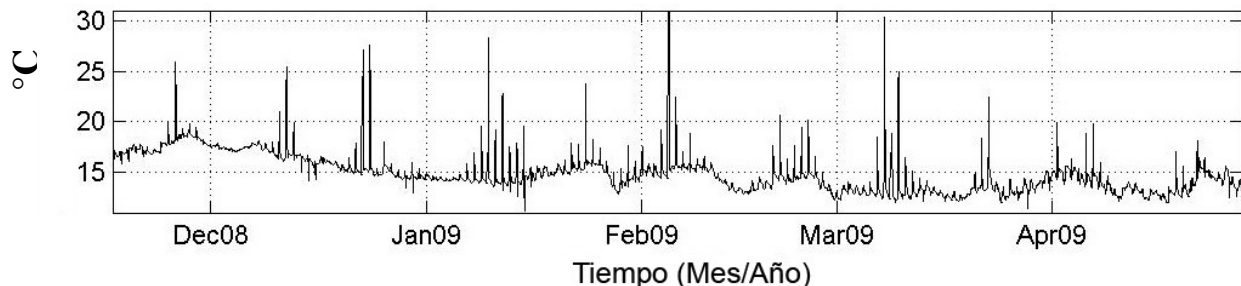


Figura 71. Variación de la temperatura en el intermareal rocoso en intervalos de marea en Punta Baja, Baja California, México, durante el periodo de Diciembre del 2008 a Abril del 2009 (IIO-UABC).

Estudios recientes han demostrado que ciertos organismos que habitan en ambientes térmicamente muy variables como el intermareal ($>15^{\circ}\text{C}$), no necesariamente van a mostrar un mejor desempeño fisiológico en su respuesta al estrés térmico, que aquellos que habitan en ambientes moderadamente variables de temperatura como lo es en el submareal ($<10^{\circ}\text{C}$) (Tomanek, 2010). Lo anterior ha sido observado mediante experimentos en la expresión de proteínas de choque térmico (hsp's) en gasterópodos del género *Chlorostoma*, los cuales habitan a diferentes niveles de la zona costera. Se determinó que los organismos que habitan en la zona del intermareal se encuentran viviendo cerca de su límite de tolerancia y por lo tanto, muy cerca del umbral de expresión de Hsp's, por lo que una variación de temperatura ($5-6^{\circ}\text{C}$) puede sobrepasar su límite de expresión y así comprometer su supervivencia. A diferencia del intermareal, los congéneres que habitan en el submareal tienen un perfil de expresión basal o nula de proteínas de choque térmico, y por lo tanto pueden responder a un mayor rango de temperaturas, muy por arriba de las que actualmente experimentan (Tomanek y Somero, 1999; Tomanek y Somero, 2002; Somero 2011).

De manera similar trabajos realizados en *S. purpuratus* sobre la expresión de hsp's a lo largo de su distribución geográfica, han demostrado que esta especie se encuentra viviendo cerca de su límite de tolerancia térmica y por lo tanto, puede ser más susceptibles a incrementos de temperatura en el ambiente (Osovitz y Hofmann, 2005; Hammond y Hofmann 2010). Así, lo mencionado anteriormente nos permite entender la diferencia en la termotolerancia que se observó durante esta investigación en estadios larvales tardíos de erizo rojo y erizo morado. Por otro lado, experimentos en la expresión de proteínas de choque térmico (hsp's) durante el desarrollo larval del erizo rojo, serán necesarios para poder entender a nivel molecular por qué el erizo rojo presenta una mayor termotolerancia que el erizo morado y por lo tanto, una mejor capacidad para ajustarse a cambios de temperatura en el ambiente.

3.4.2. Retraso de la metamorfosis y supervivencia post-metamórfica

En relación con el retraso de la metamorfosis, se observó que a medida que se incrementó la temperatura de los tratamientos disminuyó el número de larvas que iniciaron la metamorfosis en ambas especies de erizo (*S. purpuratus* y *S. franciscanus*); independientemente si la inducción de las larvas fue de manera natural mediante el uso de biopelículas (*S. purpuratus*), ó de manera

artificial mediante el cloruro de potasio. Este último, se sabe es muy eficaz para inducir a la metamorfosis en una gran variedad de larvas de invertebrados marinos (Gallardo y Sanchez 2001; Carpizo-Ituarte *et al.* 2002; Yang *et al.* 2008). Algo similar fue observado por Chen y Chen (1992) para la galleta de mar *Arachnoides placenta*, quienes demostraron que temperatura de 28°C disminuyó el porcentaje de metamorfosis a niveles inferiores al 40% y a una temperatura de 34°C a menos del 10%. Comparado con lo anterior, en el presente estudio se encontró para *S. purpuratus* una disminución en el porcentaje de metamorfosis entre el 60 y 80% a una temperatura de 28°C, cuando las larvas fueron sometidas a estrés térmico durante 0.5, 4 y 6 horas y se redujo a 100% a una temperatura de 32°C. En contraste, en el erizo rojo (*S. franciscanus*), se observó una disminución entre el 10 y 40% a los 28°C, cuando las larvas fueron sometidas a estrés térmico durante 2, 3 y 6 horas de exposición. De esta manera se determinó que el erizo rojo tiene una mayor tolerancia al estrés térmico y por lo tanto las larvas tienen la capacidad de iniciar la metamorfosis en condiciones en donde el erizo morado ya no tiene la capacidad de responder.

Se ha documentado que la aclimatación de los organismos puede favorecer su respuesta al estrés térmico, principalmente en organismos euritérmicos que habitan en ambientes moderadamente variables de temperatura como lo es el submareal, a diferencia de los que habitan en ambientes muy variables como el intermareal, en donde se ha documentando que existe una limitación debido a que se encuentran viviendo cerca de su límite de tolerancia y por lo tanto, tienen una menor capacidad de responder a mayores incrementos de temperatura (Tomanek, 2010; Tomanek y Somero 2002). En este aspecto, se observó que una aclimatación de poca duración (30 min.) fue suficiente para favorecer el desempeño fisiológico de las larvas de erizo morado, lo cual les permitió iniciar la metamorfosis. Para *S. franciscanus* se observó que la aclimatación de 24 horas a 20°C favoreció la respuesta de la larva para iniciar metamorfosis después de haber sido expuestas a 29°C durante 2 horas, algo que no ocurrió cuando las larvas se aclimataron durante 24 horas a 23°C, ya que no se observó metamorfosis alguna. Experimentos posteriores que se enfoquen en investigar a nivel molecular y nivel organismo la importancia de la aclimatación en estadios larvales tempranos y tardíos, serán necesarios para entender de qué manera la aclimatación puede ayudar a mejorar el desempeño fisiológico de las larvas durante la metamorfosis.

Además de observar una tendencia en la disminución en el porcentaje de metamorfosis en relación al incremento de temperatura, se observó esa misma tendencia con el número de larvas que presentaron metamorfosis incompleta, muchas de las cuales no llegaron a terminarla con éxito. Estudios previos realizados en crustáceos, moluscos y equinodermos (Thiyagarajan *et al.* 2003; Botello y Krug, 2006; Elkin y Marshall, 2007) mostraron que el éxito en la fijación y metamorfosis de las larvas, depende de las reservas energéticas con las que cuentan. En este aspecto, es bien sabido que la temperatura es el factor universal más importante que influye en los procesos fisiológicos de los organismos (Bassim y Sammarco 2003); por lo que aumentos en la temperatura pueden generar daños en las membranas celulares y en la síntesis y estabilidad térmica de las proteínas (Somero, 2002), reflejándose en un incremento en la tasa metabólica y por consecuencia un gasto energético mayor para los organismos (Clarke y Fraser, 2004). Por lo tanto, eventos de estrés ambiental como en el caso del incremento en la temperatura, pueden tener un efecto negativo en la cantidad de reservas energéticas almacenadas debido al incremento en su tasa metabólica, ocasionando una disminución de la fijación de larvas que inician la metamorfosis. De acuerdo a lo anterior y a los resultados obtenidos en esta investigación, es posible que el retraso de la metamorfosis y el incremento de larvas con metamorfosis incompleta que se observó en las larvas de *S. purpuratus* y *S. franciscanus* se deba a la disminución de sus reservas energéticas por el incremento metabólico generado por el estrés térmico al que fueron sometidas. Es posible que dependiendo de la capacidad de energía acumulada en cada larva y del tiempo que requiera para concluirla, ésta tendrá la capacidad de iniciar o no la metamorfosis. Estudios posteriores que cuantifiquen el contenido y gasto energético por parte de las larvas previas a la metamorfosis, serán necesarios para determinar la cantidad de energía requerida por parte de las larvas para iniciar y terminar con éxito la metamorfosis en condiciones ambientales de estrés térmico.

Las consecuencias del retraso de la metamorfosis en los organismos están siendo recientemente comprendidas. En esta aspecto, Pechenick (2006) reportó que el retraso de la metamorfosis puede generar efectos latentes en los organismos, es decir, un evento de estrés ambiental (*p.ej.* limitación de comida, estrés por salinidad, incremento en el gasto energético, contaminación, radiación ultravioleta) experimentado durante la etapa larval, se va a reflejar en su etapa bentónica como post-larva o juvenil, como puede ser una reducción significativa en su supervivencia y en la tasa de crecimiento.

Esto se ha documentado en especies de briozooarios, gasterópodos, poliquetos, crustáceos y equinodermos (Qian y Pechenick, 1998; Wendt, 1998; Väitilingon *et al.* 2001; Giménez, 2006). En relación a lo anterior, se observó que la supervivencia post-metamórfica disminuyó a medida que se incrementó el tiempo de exposición de estrés térmico (4 y 6 horas) a 28°C. Así mismo, en erizo morado se observó que para el tratamiento de 26°C con 4 horas de exposición, la supervivencia post-metamórfica se redujo a 20% a los 6 días de evaluación; en este tratamiento se observó un porcentaje de metamorfosis del 80% y un porcentaje de metamorfosis incompleta del 60%, en donde el retraso de la metamorfosis por efecto de la temperatura no fue muy significativo en relación al resto de los tratamientos. De esta manera, es probable que la disminución de la supervivencia post-metamórfica que se observó, sea consecuencia de los efectos latentes ocasionados por el retraso de la metamorfosis de las larvas debido a condiciones de estrés térmico experimentadas en la etapa de larva competente. Por otro lado, las consecuencias ecológicas debido al retraso de la metamorfosis han sido documentadas en algunos invertebrados marinos (Pechenick, 1990, 2006). En este aspecto, es posible que se pueda ver afectada la selección de los sustratos favorables por parte de las larvas para llevar a cabo el asentamiento y la metamorfosis, teniendo como consecuencia que no metamorfoseen en los sitios adecuados en presencia de las claves ambientales específicas (biopelículas) y por lo tanto, obligándolas a prolongar su vida larval en busca de los sustratos adecuados, como ha sido reportado por diversos autores (Gebauer, *et al.* 2003; Toonen y Tyre, 2007).

En general, las de *S. purpuratus* y *S. franciscanus* tienen una alta termotolerancia a incrementos bruscos de temperatura, sin embargo esto no quiere decir que no serán afectados por el incremento en la temperatura del océano por efectos del calentamiento global o alteraciones térmicas del océano, haciendo énfasis en el erizo morado, ya que al parecer es más sensible que el erizo rojo y habita en zonas en donde experimentará una mayor variación de temperatura. De esta manera, es posible que la supervivencia de las larvas en el momento de la metamorfosis pueda ser afectada de una manera directa, por eventos de temperaturas extremas en el intermareal, así como también en forma indirecta en ambas especies por otros procesos en el ecosistema, como por ejemplo mayor depredación, pastoreo y disminución de fitoplancton (alimento), entre otros. Por consiguiente, estudios que se concentren en determinar los límites de tolerancia térmica entre las especies que habitan un ecosistema y su capacidad de ajustarse a incrementos de temperaturas extremas (zona intermareal), así como a cambios en escenarios de

cambio climático (acidificación del océano, aumentos del nivel del mar, incrementos en salinidad, entre otros), ayudarán a entender cómo los organismos y en particular ambas especies de erizo (*S. purpuratus* y *S. franciscanus*) podrían ser afectados por estas alteraciones ambientales (Somero, 2002; Pörtner, 2008; Visser, 2008).

Otro aspecto importante derivado de esta investigación, fue el determinar que el estrés térmico no induce a la metamorfosis en ambas de especies de erizo. Se ha documentado que temperaturas elevadas inducen a la metamorfosis en una variedad de invertebrados marinos, como se ha reportado para el gasterópodo *Strombus gigas* en donde temperaturas de 37-38°C en un tiempo de exposición de 2 y 4 horas inducen a la metamorfosis en un 70 y 80% (Boettcher, 2005).

3.5 Conclusión

Los resultados obtenidos en la presente investigación, muestran que larvas de erizo morado (*S. purpuratus*) y erizo rojo (*S. franciscanus*) en estadios tardíos, tienen una alta termotolerancia al estrés térmico y, temperaturas alrededor de los 27°C en periodos de tiempo cortos (horas) pueden afectar el proceso de la metamorfosis. Así mismo, a medida que aumenta la temperatura se incrementa el retraso de la metamorfosis, lo que pudiera tener implicaciones en la distribución de estas especies, ya que parecen ser particularmente sensibles en el momento de transición de la columna de agua a la elección de un sustrato en el bentos. Hasta ahora son pocos los trabajos realizados que documenten el efecto de la temperatura en el retraso de la metamorfosis en invertebrados marinos y ninguno en particular en el erizo morado y erizo rojo, por lo que en este trabajo se presentan las primeras aproximaciones del límite de tolerancia térmica en estadios larvales tardíos y el efecto del estrés térmico durante el inicio de la metamorfosis.

Apéndice I

Punta Baja

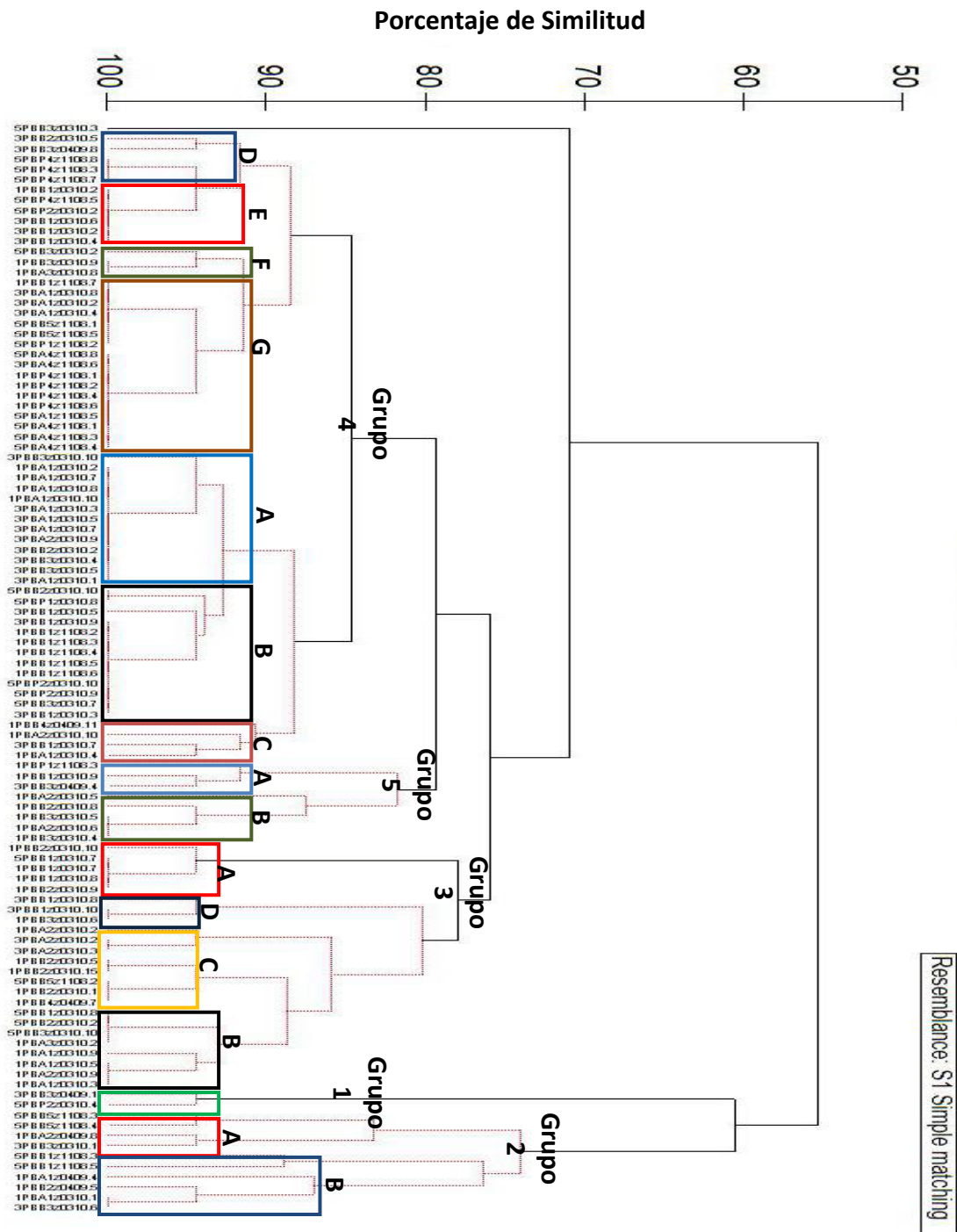


Figura 72. Clúster de porcentajes de similitud de pruebas bioquímicas de bacterias aisladas de Punta Baja. Separación de grupos metabólicos del 1 al 5.

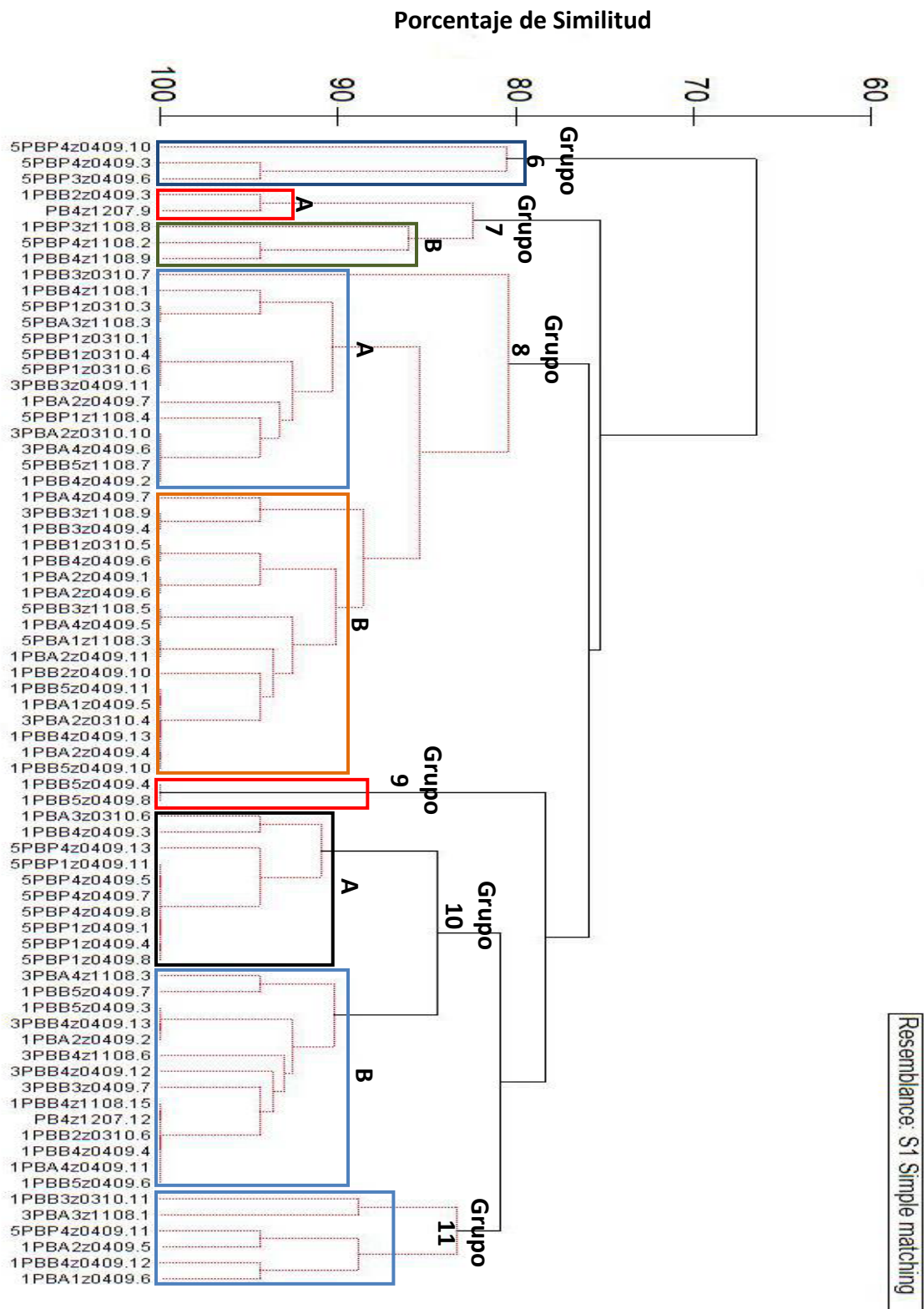


Figura 73. Clúster de porcentajes de similitud de pruebas bioquímicas de bacterias aisladas de Punta Baja. Separación de grupos metabólicos del 6 al 11.

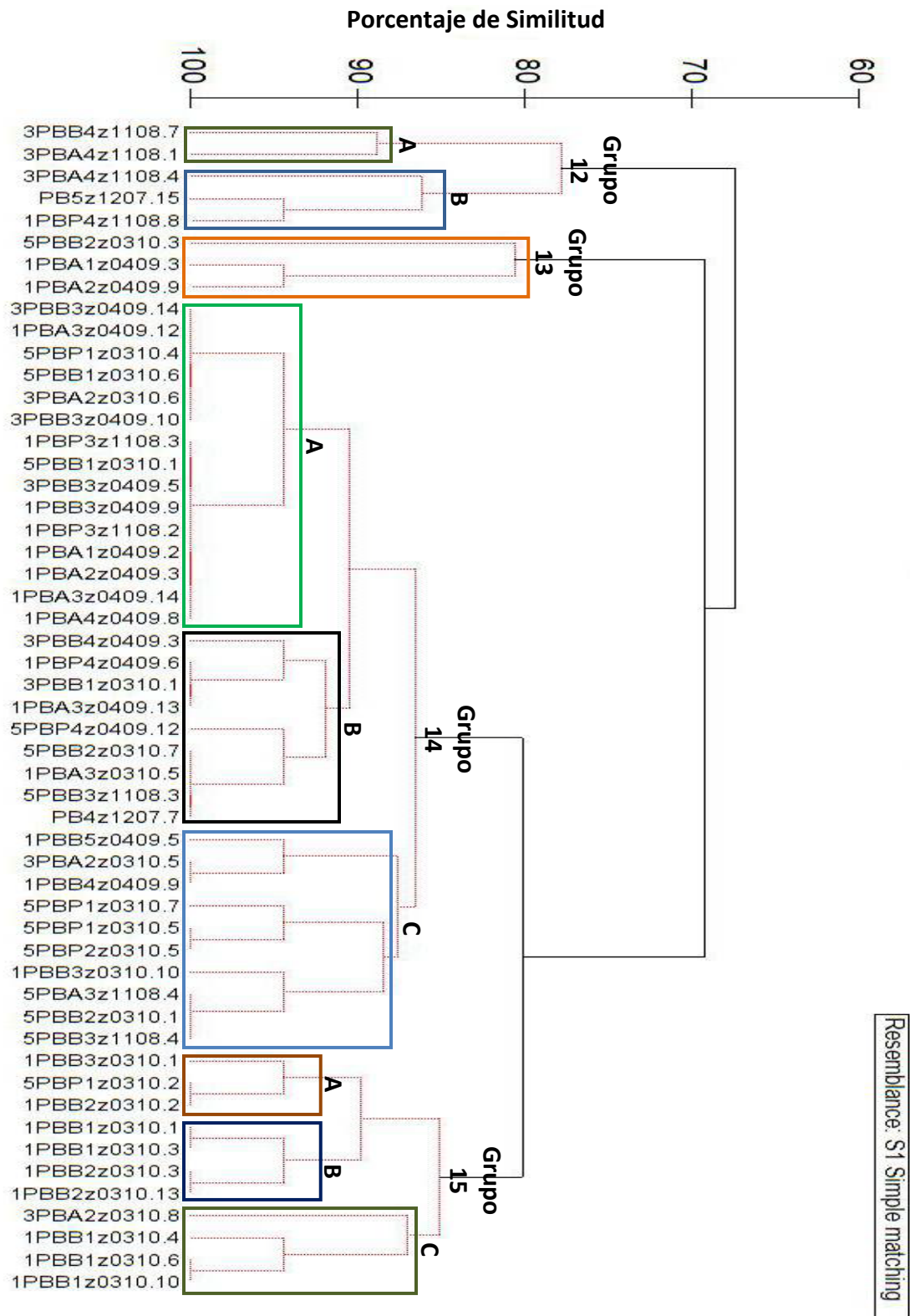


Figura 74. Clúster de porcentajes de similitud de pruebas bioquímicas de bacterias aisladas de Punta Baja. Separación de grupos metabólicos del 12 al 15.

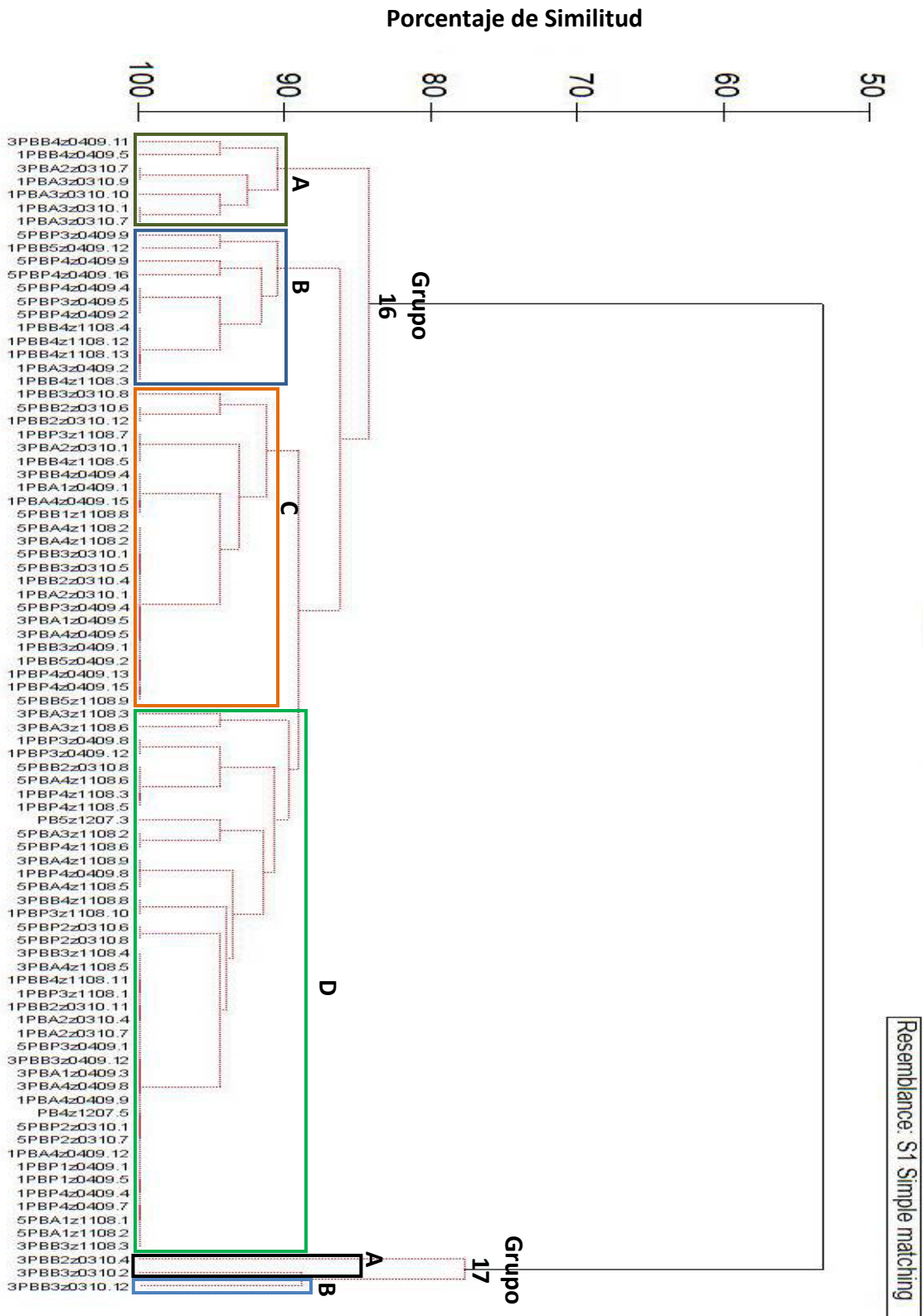


Figura 75. Clúster de porcentajes de similitud de pruebas bioquímicas de bacterias aisladas de Punta Baja. Separación de grupos metabólicos 16 y 17.

Playa Esmeralda

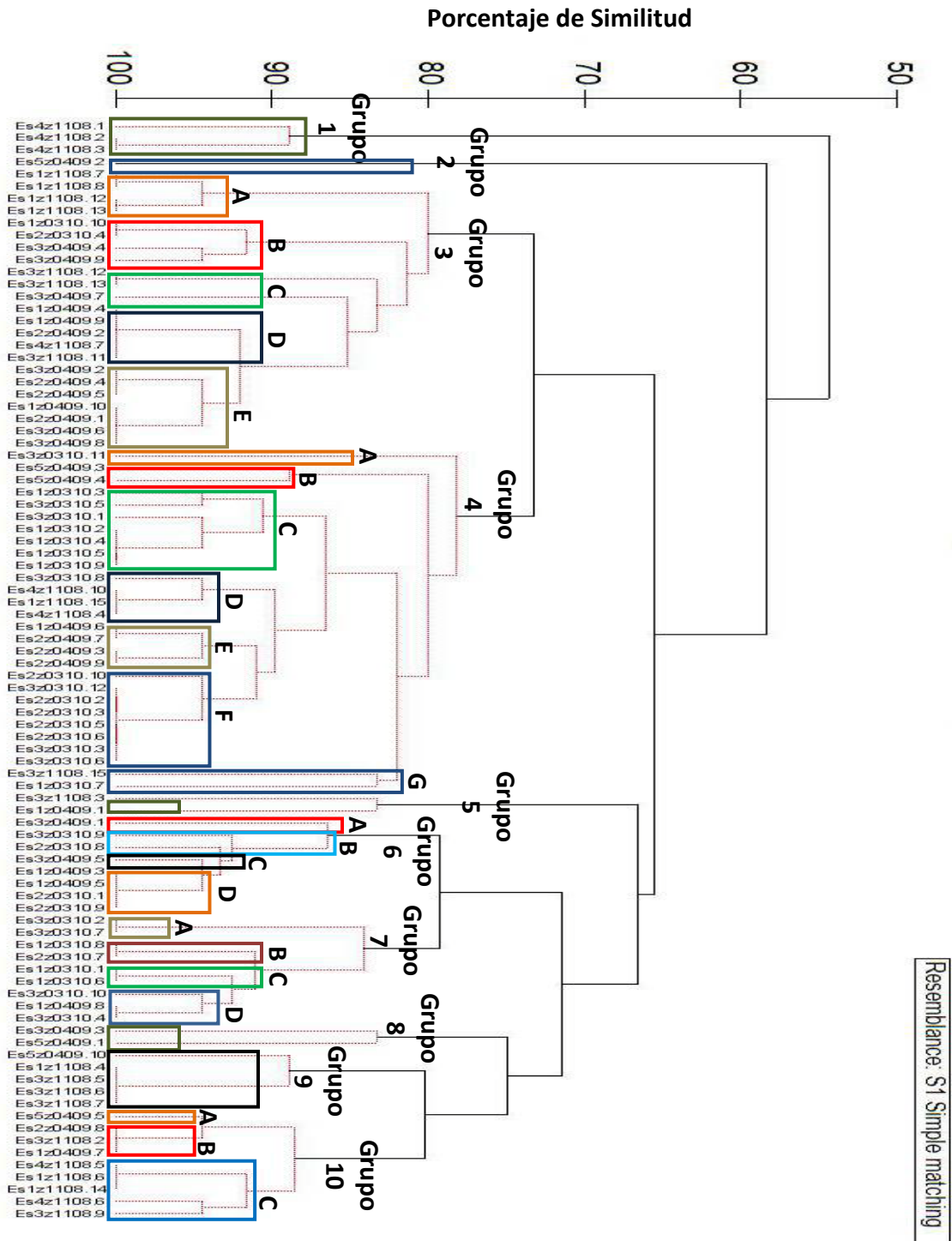


Figura 76. Clúster de porcentajes de similitud de pruebas bioquímicas de bacterias aisladas de Playa Esmeralda. Separación de grupos metabólicos del 1 al 10.

Apéndice II

Tabla 5. Grupos metabólicos de bacterias aisladas de la localidad de Punta Baja, Baja California, México entre Diciembre del 2007 y Marzo del 2010.

Grupo	# Cepas	Sustratos del aislado	Características metabólicas del grupo
1			
A	2	Agua de mar.	Cocobacilos, Gram (-), Catalasa y oxidasa (-), Movilidad (-), no oxidan ni fermentan la glucosa, no crecen en salinidad 0,6 y 8%, no crece en medio TCBS, crecen en 0/129 a 10µg/ml pero no a 150 µg/ml, no crece en medio MacConkey.
2			
A	4	<i>B. orbigniana</i> , Choro, <i>C. vancouverensis</i> .	Cocos y cocobacilos, Gram (+), catalasa y oxidasa (-), bacterias no móviles solo 1 cepa es móvil, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), crecimiento sin sal, no crecen en 6 y 8% de sal, no crecen en medio TCBS, 2 cepas no crecen en 0/129 el resto si crece en 10 y 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey.
B	6	Erizo morado, Choro, <i>C. vancouverensis</i> .	Bacilos o cocobacilos, Gram (+), catalasa y oxidasa (+) solo 1 cepa fue oxidasa (-), movilidad (+) a excepción de 1 cepa, oxidan y fermentan la glucosa, crecen sin sal y algunas hasta en concentración de 6%, no crece en medio TCBS, crecen en 0/129 a 10 µg/ml y 3 cepas en 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey.
3			
A	5	Agua de mar, Erizo morado.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en 0 y 8% de sal pero si en 6%, crecen en medio TCBS pero no fermentan la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml solo 1 cepa no crece a 150 µg/ml, crecen en medio MacConkey y fermentan la lactosa.
B	9	Agua de mar, Erizo morado, <i>C. vancouverensis</i> .	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles a excepción de 1 cepa, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0, 6 y 8% a excepción de 1 cepa que creció a 6%, crecimiento en medio TCBS pero no fermentan la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml pero no a 150 µg/ml, crecen en medio MacConkey pero no fermentan la lactosa.
C	8	Agua de mar, <i>B. orbigniana</i> , <i>C. vancouverensis</i> .	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias no móviles a excepción de 1 cepa, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0, 6 y 8%, crecen en medio TCBS pero no fermentan la sacarosa, no crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey a excepción de 2 cepas que si crecieron pero no fermentan la lactosa.
D	3	Erizo morado, <i>C. vancouverensis</i> .	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, no oxidan la glucosa pero si la fermentan (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad 0, 6 y 8%, no crecen en medio TCBS, no crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey.
4			
A	13	<i>C. vancouverensis</i> , erizo morado, agua de mar.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0, 6 y 8%, crecen en medio TCBS y fermentan la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml pero no a 150 µg/ml, crecen en medio MacConkey pero no fermentan la lactosa.

Continuación

B	13	<i>C. vancouverensis</i> , Agua de mar, erizo morado.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0 y 8% pero si en 6%, crecen en medio TCBS y fermentan la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml pero no a 150 µg/ml, crecen en medio MacConkey pero no fermentan la lactosa.
C	3	<i>C. vancouverensis</i> , erizo morado.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en 0% de salinidad pero si algunas en 6 y 8%, crecen en medio TCBS pero no fermentan la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, crecen en medio MacConkey pero no fermentan la lactosa.
D	5	<i>C. vancouverensis</i> , Agua de mar.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0 y 8% pero si en 6%, crecen en medio TCBS y fermentan la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml pero no a 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey a excepción de 1 cepa pero no fermenta la lactosa.
E	6	<i>C. vancouverensis</i> , Erizo morado, agua de mar.	La única diferencia con respecto al grupo 5D es que si crecen en medio MacConkey y fermentan la lactosa.
F	3	<i>C. vancouverensis</i> .	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad 0, 6 y 8%, crecen en medio TCBS y fermentan la sacarosa, no crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, crecen en medio MacConkey y fermentan la lactosa.
G	17	<i>C. vancouverensis</i> , <i>B. orbigniana</i> , Erizo morado.	La única diferencia con respecto al grupo 5F es que no crecen en medio MacConkey.
5			
A	3	Erizo morado, agua de mar.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0% pero si en 6 y 8% de sal, crecen en medio TCBS y fermentan la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey a excepción de 1 cepa que si creció y fermenta la lactosa.
B	5	<i>C. vancouverensis</i> , agua de mar.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0, 6 y 8%, crecen en medio TCBS y fermentan la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, crecen en medio MacConkey y fermentan la lactosa.
6			
	3	<i>C. vancouverensis</i> , agua de mar.	Bacilos y cocobacilos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles excepto 1 cepa, no oxidan la glucosa pero si la fermentan (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0, 6 y 8%, no crecen en medio TCBS, crecimiento en medio con el agente 0/129 en 10 y 150 µg/ml, crecen en medio MacConkey pero no se evaluó si fermentan o no la lactosa.
7			
A	2	Choro.	Cocobacilos, Gram (-), catalasa (+), oxidasa (-), bacterias móviles, oxidan la glucosa pero no la fermentan (aerobias estrictas), no crecen en medio sin sal (0%) pero si crecen en salinidades de 6 y 8%, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml pero no a 150 µg/ml, 1 cepa creció en medio MacConkey pero no fermenta la lactosa.

Continuación

B	3	<i>B. orbigniana</i> , agua de mar, <i>C. vancouverensis</i> .	La diferencia con el grupo 8A radica en que no crecen en salinidad de 8%, solo uno cepa creció en medio sin sal y no crecen en medio MacConkey a excepción de 1 cepa que si lo hizo y fermenta la lactosa.
8			
A	14	<i>C. vancouverensis</i> , <i>B. orbigniana</i> , Erizo morado, agua de mar, choro.	Cocobacilos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), la mayoría bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), la gran mayoría no crecen en salinidad de 0, 6 y 8%, no crecen en medio TCBS, la mitad crece en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml pero ninguna crece a 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey.
B	18	<i>B. orbigniana</i> , agua de mar, erizo morado, <i>C. vancouverensis</i> , choro, <i>L. pacifica</i> .	Cocobacilos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), en su gran mayoría bacterias móviles, la mayoría oxidan y fermentan la glucosa a excepción de 6 cepas que solo la fermentan (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0 y 8%, solo 6 cepas crecieron en salinidad de 6%, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey.
9			
	2	<i>L. pacifica</i> .	Cocobacilos, Gram (-), catalasa (-), oxidasa (+), bacterias móviles, no oxidan la glucosa pero si la fermentan (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0 y 8% pero si en 6% de sal, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 en 10 y 150 µg/ml, crecen en medio MacConkey pero no fermentan la lactosa.
10			
A	10	<i>C. vancouverensis</i> , erizo morado.	Cocobacilos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, no oxidan la glucosa pero si la fermentan (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0% pero si en 6 y 8%, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, crecen en medio MacConkey donde 2 cepas fermentaron la lactosa el resto no se evaluó.
B	14	<i>C. vancouverensis</i> , <i>L. pacifica</i> , choro, agua de mar, <i>B. orbigniana</i> .	Cocobacilos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, su gran mayoría oxidan y fermentan la glucosa a excepción de 4 cepas que solo la fermentan, no crecen en medio sin sal, crecen en salinidad de 6 y 8%, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, su gran mayoría no crece en medio MacConkey a excepción de 2 cepas que si crecieron una cepa fermenta la lactosa mientras que la otra no.
11			
A	2	<i>C. vancouverensis</i> , agua de mar.	Cocobacilos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias no móviles, no oxidan la glucosa pero si la fermentan (anaerobias facultativas), no crecen en medio sin sal, crecen en salinidad de 6 y 8%, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml pero no a 150 µg/ml, solo una cepa creció en medio MacConkey pero no fermenta la lactosa.
B	2	<i>C. vancouverensis</i> , choro	La diferencia con el grupo 12A, es que solo 1 cepa creció en medio sin sal, crecen en medio con el agente 0/129 a 150 µg/ml y no crecen en medio MacConkey.
C	2	<i>C. vancouverensis</i> , erizo morado.	La diferencia con el grupo 12A y B es que 1 cepa no fermenta la glucosa (aerobia estricta), y la otra cepa creció en medio MacConkey y fermenta la lactosa.

Continuación

12

A	2	<i>C. vancouverensis</i> .	Bacilos rectos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles o no, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), crecen en salinidades de 0, 6 y 8%, no crecen en medio TCBS, no crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey.
B	3	<i>C. vancouverensis</i> , <i>Plocamium sp.</i>	La diferencia con el grupo 13A es que son oxidasa (-), todas las bacterias son móviles y crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml.

13

	4	<i>L. pacifica</i> , agua de mar, erizo morado, choro.	Bacilos rectos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+) a excepción de 1 cepa que es oxidasa (-), bacterias no móviles, no oxidan ni fermentan la glucosa (aerobias estrictas), no crecen en medio sin sal (0%), crecen en salinidad de 6 y 8%, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, algunas pueden crecer en medio MacConkey y pueden o no fermentar la lactosa.
--	---	--	--

14

A	15	<i>B. orbigniana</i> , agua de mar, erizo morado, choro.	Bacilos rectos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0,6 y 8%, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml y más de la mitad de las cepas crecen a 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey.
B	9	<i>C. vancouverensis</i> , agua de mar, erizo morado, choro.	La diferencia con el grupo 15A radica en que las bacterias de este grupo no oxidan la glucosa solo la fermentan (anaerobias facultativas) y más de la mitad de las cepas crecen en medio con el agente 0/129 a 150 µg/ml.
C	9	<i>C. vancouverensis</i> , erizo morado, agua de mar.	Bacilos rectos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias no móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0 y 8%, algunas cepas crecen en salinidad del 6%, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey.

15

A	3	<i>C. vancouverensis</i> , erizo morado, agua de mar.	Bacilos rectos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0 y 8% pero si en 6% de sal, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml pero no a 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey a excepción de 1 cepa pero no fermenta la lactosa.
B	4	Erizo morado, agua de mar.	La única diferencia con el grupo 16A, es que crecen en medio TCBS y fermentan la sacarosa y 2 cepas crecieron en medio MacConkey y fermentan la lactosa, el resto de las cepas no crece en medio MacConkey.
C	4	Erizo morado, agua de mar.	Las diferencias con los grupos 16A y B radican en que crecen en medio TCBS pero no fermentan la sacarosa, además todas crecieron en medio MacConkey y fermentan la lactosa.

16

A	7	<i>C. vancouverensis</i> , agua de mar.	Bacilos rectos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, la mitad oxidan y fermentan la glucosa, la otra mitad solo la fermentan (anaerobias facultativas), la mayoría no crecen en salinidad 0 y 8% pero si al 6%, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, crece en medio MacConkey y fermenta la lactosa.
B	12	<i>L. pacifica</i> , agua de mar, <i>B. orbigniana</i> <i>C. vancouverensis</i> .	Las únicas diferencias con el grupo 16A, es que crecen en salinidad de 8% y crecen en medio MacConkey pero no fermentan la lactosa.

Continuación

C	24	<i>C. vancouverensis</i> , agua de mar, <i>L. pacifica</i> , erizo morado, <i>B. orbigniana</i> .	Bacilos rectos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), su gran mayoría bacterias móviles, no oxidan la glucosa pero si la fermentan (anaerobias facultativas), no crecen en medio sin sal, crecen en salinidad de 6% y su gran mayoría crecen en 8% de sal, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml pero no a 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey.
D	39	<i>C. vancouverensis</i> , <i>B. orbigniana</i> , agua de mar, erizo morado, <i>Plocamium</i> <i>sp.</i> , choro.	Bacilos rectos, Gram (-), su gran mayoría catalasa y oxidasa (+) aunque algunas cepas son oxidasa (-), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en medio sin sal, crecen en 6% de salinidad y la mayoría crecen en 8%, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml y no crecen en medio MacConkey
17			
A	2	<i>C. vancouverensis</i> , agua de mar.	Cocos y cocobacilos, Gram (+), catalasa y oxidasa (-), bacterias móviles, solo una cepa oxida la glucosa pero no la fermentan (aerobias estrictas), no crecen en salinidad 0, 6 y 8%, no crece en medio TCBS, crece en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml y solo 1 cepa creció a 150 µg/ml, no crecen en medio MacConkey.
B	1	<i>C. vancouverensis</i> .	Cocos, Gram (-), catalasa y oxidasa (-), bacteria no móvil, no oxida ni fermenta la glucosa (aerobias estrictas), no crecen en salinidad 0, 6 y 8%, no crece en medio TCBS, crece en medio con el agente 0/129 a 10 y 150 µg/ml, no crece en medio MacConkey.
18			
A	4	<i>C. vancouverensis</i> , agua de mar.	Bacilos rectos y curvos, Gram (+), catalasa (+) y 2 cepas son oxidasa (-), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en medio sin sal, solo 2 cepas crecen en salinidad de 6 y 8%, 2 cepas no crecen en medio TCBS mientras las otras 2 si crecen y solo una fermenta la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml y solo 1 cepa no crece a 150 µg/ml, 2 cepas no crecen en medio MacConkey, las otras 2 cepas si crecen pero solo 1 fermenta la lactosa.
B	3	Erizo morado, agua de mar.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa a excepción de una cepa que solo la fermenta (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0 y 8% y algunas si crecen en 6% de sal, no crecen en medio TCBS, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/ml a excepción de 1 cepa, si crecen a 150 µg/ml a excepción de 1 cepa, crecen en medio MacConkey pero no fermentan la lactosa.

Tabla 6. Grupos metabólicos de bacterias aisladas de la localidad de Playa Esmeralda, Baja California, México entre Noviembre del 2008 y Marzo del 2010.

Grupo	# Cepas	Sustratos del aislado	Características metabólicas del grupo
1	3	Agua de mar.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (-), bacterias móviles, no oxidan ni fermentan la glucosa, solo crecen en salinidad del 3%, crecen en medio TCBS fermentando la sacarosa, tolerantes al agente 0/129 (10 y 150 µg/mL), algunas crecen en medio MacConkey.
2	1	<i>C. vancouverensis</i> .	Bacilos rectos, Gram (+), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, fermentan la glucosa pero no la oxidan (anaerobias facultativas), solo crecen en salinidad de 3%, crecen en medio TCBS sin fermentar la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/mL pero no a 150 µg/mL, crecen en medio MacConkey.
3			
A	4	Erizo Negro.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (-), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidades de 0 y 8% y algunas crecen en 6%, crecen en medio TCBS fermentando la sacarosa, son resistentes al agente 0/129 y no crecen en medio MacConkey.
B	4	<i>C. canaliculatus</i> , erizo negro, agua de mar.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), necesitan sal para crecer, pueden crecer en condiciones hipersalinas (6 y 8%), crecen en medio TCBS fermentando la sacarosa, son tolerantes al agente 0/129, algunas crecen en medio MacConkey fermentando la lactosa.
C	3	<i>C. vancouverensis</i> , <i>C. canaliculatus</i> .	Bacilos curvos y cocobacilos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), solo crecen en salinidad de 3%, crecen en medio TCBS fermentando la sacarosa, tolerantes al agente 0/129, algunas pueden crecer en medio MacConkey.
D	5	<i>C. vancouverensis</i> , erizo negro, agua de mar.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), solo crecen en salinidad de 3%, crecen en medio TCBS fermentando la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/mL pero no a 150 µg/mL, no crecen en medio MacConkey.
E	7	<i>C. canaliculatus</i> , agua de mar, erizo negro.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en 0 y 8% de salinidad, algunas crecen en 6% de sal, crecen en medio TCBS fermentando la sacarosa, crecen en medio con el agente 0/129 a 10 µg/mL pero no a 150 µg/mL, no crecen en medio MacConkey.
4			
A	1	<i>C. vancouverensis</i> .	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias no móviles, fermentan la glucosa pero no la oxidan (anaerobias facultativas), solo crecen en salinidad de 3%, crecen en medio TCBS pero no fermentan la sacarosa, tolerantes al agente 0/129, crecen en medio MacConkey fermentando la lactosa.
B	2	<i>C. vancouverensis</i> .	Bacilos curvos, Gram (+), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), solo crecen en salinidad de 3%, crecen en medio TCBS pero no fermentan la sacarosa, sensibles al agente 0/129, algunas crecen en medio MacConkey.

Continuación

C	7	<i>C. vancouverensis</i> , erizo negro.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles excepto 1 cepa, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), solo crecen en 3% de salinidad, crecen en medio TCBS sin fermentar la sacarosa, resistentes al agente 0/129 a 10 µg/mL pero algunas son sensibles a una concentración de 150 µg/mL, crecen en medio MacConkey sin fermentar la lactosa.
D	4	<i>C. vancouverensis</i> , erizo negro, agua de mar.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), solo crecen en salinidad de 3%, crecen en medio TCBS sin fermentar la sacarosa, resistentes al agente 0/129, no crecen en medio MacConkey a excepción de 1 cepa la cual fermenta la lactosa.
E	4	Erizo negro, agua de mar.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen en salinidad de 0 y 8%, algunas pueden crecer en 6% de salinidad, resistentes al agente 0/129 a 10 µg/mL pero sensibles a una concentración de 150 µg/mL, no crecen en medio MacConkey.
F	8	<i>C. vancouverensis</i> , agua de mar.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), solo crecen en salinidad de 3%, crecen en medio TCBS sin fermentar la sacarosa, resistentes al agente 0/129 a 10 µg/mL pero sensibles a una concentración de 150 µg/mL, crecen en medio MacConkey fermentando la lactosa.
G	2	<i>C. vancouverensis</i> , erizo negro.	Bacilos curvos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), no crecen sin sal, crecen en salinidad de 6% y algunas al 8%, crecen en medio TCBS sin fermentar la sacarosa, resistentes al agente 0/129 a 10 µg/mL pero sensibles a una concentración de 150 µg/mL, crecen en medio MacConkey sin fermentar la lactosa.
5	2	<i>C. vancouverensis</i> , erizo negro.	Bacilos rectos, Gram (-), catalasa y oxidasa (-), bacterias móviles o no, pueden oxidar y fermentar la glucosa (anaerobias facultativas), pueden o no crecer en salinidad de 0%, pueden crecer en 6% de sal pero no al 8%, no crecen en medio TCBS, son resistentes al agente 0/129 y no crecen en medio MacConkey.
6			
A	1	<i>C. canaliculatus</i> .	Cocobacilo, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacteria móvil, oxida y fermenta la glucosa (anaerobia facultativa), no crece en medio sin sal y puede crecer en condiciones hipersalinas (6 y 8%), crece en medio TCBS sin fermentar la sacarosa, resistente al agente 0/129 a 10 µg/mL pero sensible a 150 µg/mL, no crece en medio MacConkey.
B	2	<i>C. vancouverensis</i> , agua de mar.	La diferencia con el grupo 6A es que no crece en medio TCBS, es tolerante al agente 0/129 y una cepa creció en medio MacConkey sin fermentar la lactosa.
C	1	<i>C. canaliculatus</i> .	La diferencia con los grupos 6A y B es que crece en medio TCBS pero fermenta la sacarosa y no crece en medio MacConkey.
D	4	Erizo negro, agua de mar.	Cocobacilos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), necesitan sal para crecer y pueden crecer en condiciones hipersalinas (6 y 8%), resistentes al agente 0/129 y no crecen en medio MacConkey.
7			
A	2	<i>C. vancouverensis</i> .	Bacilos rectos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias no móviles, fermentan la glucosa pero no la oxidan (anaerobias facultativas), necesitan sal para crecer y pueden crecer en condiciones hipersalinas (6 y 8%), no crecen en medio TCBS, resistentes al agente 0/129, crecen en medio MacConkey fermentando la lactosa.

Continuación

B	2	Erizo negro, agua de mar.	Bacilos rectos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias no móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), necesitan sal para crecer y pueden crecer en condiciones hipersalinas (6 y 8%), no crecen en medio TCBS, resistentes al agente 0/129, no crecen en medio MacConkey.
C	2	Erizo negro.	La diferencia con el grupo 7B es que no puede crecer en salinidades de 6 y 8%, es sensible al agente 0/129 a 150 µg/mL y crece en medio MacConkey sin fermentar la lactosa.
D	3	<i>C. vancouverensis</i> , erizo negro.	La diferencia con el grupo 7B y C es que son bacterias móviles, toleran condiciones hipersalinas (6 y 8%), no crecen en medio TCBS, resistentes al agente 0/129 y no crecen en medio MacConkey.
8			
A	1	<i>C. canaliculatus</i> .	Cocobacilos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacteria no móvil, oxida y fermenta la glucosa (anaerobia facultativa), solo crece en 3% de salinidad, crece en medio TCBS sin fermentar la sacarosa, resistente al agente 0/129 a 10 µg/mL pero sensible a una concentración de 150 µg/mL, no crece en medio MacConkey.
B	1	<i>C. vancouverensis</i> .	La diferencia con el grupo 8A es que es un cocobacilo Gram (+), es móvil y resistente al agente 0/129.
9			
	5	<i>C. canaliculatus</i> , <i>C. vancouverensis</i> , erizo negro.	Cocobacilos, Gram (-), catalasa y oxidasa (+), bacterias móviles, oxidan y fermentan la glucosa (anaerobias facultativas), pueden crecer en medio sin sal pero no en condiciones hipersalinas (6 y 8%), no crecen en medio TCBS, resistentes al agente 0/129 a excepción de 1 cepa la cual fue sensible en ambas concentraciones, no crece en medio MacConkey.
10			
A	1	<i>C. canaliculatus</i> .	Bacilos rectos, Gram (+), catalasa y oxidasa (+), bacteria móvil, oxida y fermenta la glucosa, solo puede crecer en salinidad de 3%, no crece en medio TCBS, resistente al agente 0/129 a 10 µg/mL pero sensible a 150 µg/mL, no crece en medio MacConkey.
B	3	<i>C. vancouverensis</i> , erizo negro, agua de mar.	La única diferencia con el grupo 10A, es que son bacilos rectos Gram (-).
C	5	<i>C. vancouverensis</i> , erizo negro, agua de mar.	Solo difiere con el grupo 10B en que algunas pueden crecer en medio sin sal y son resistentes al agente 0/129 a 150 µg/mL.

Anexo I: Protocolos de Bacteriología

Preparación de Medios de cultivo

Medio sólido - Agar Marino (Difco 2216):

- 1.- Agregar 55.1g de medio en 1 litro de agua destilada.
- 2.- Calentar el medio en agitación hasta que el agar se disuelva por completo.
- 3.- Esterilizar el medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- 4.- Esperar a que se enfrie para servir en cajas o bien hasta que solidifique.

El medio de cultivo tiene un pH final de 7.6

Medio Líquido – Caldo Marino (Difco 2216):

- 1.- Agregar 37.4g de medio en 1 litro de agua destilada.
- 2.- Agitar el medio hasta que se disuelva por completo.
- 3.- Esterilizar el medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- 4.- Esperar a que se enfrie para ser utilizado.

El medio de cultivo tiene un pH final de 7.6

Preparación de medios para pruebas bioquímicas

a) Movilidad:

- 1.- Agregar 37.4g de caldo marino (Difco 2216) a 1 Litro de agua destilada.
- 2.- Agregar 5g de agar.
- 3.- Calentar hasta que el agar se disuelva y distribuir 2mL en tubos de ensayo y tapar.
- 4.- Esterilizar el medio por 15 minutos.

El pH del medio es de 7.6

b) Oxidación – Fermentación:

- 1.- Agregar 37.4g de caldo marino (Difco 2216) a 1 Litro de agua destilada.

- 2.- Agregar 3g de Bacto agar (Difco 214050).
- 3.- Agregar 0.01g de Rojo Fenol.
- 4.- Agregar 0.50g de Tris HCl.
- 5.- Calentar a ebullición hasta que el agar se disuelva.
- 6.- Esterilizar durante 15 minutos
- 7.- Aparte preparar una solución de glucosa al 10% y esterilizar junto con lo anterior.

En condiciones asépticas, en 90mL de medio de cultivo estéril adicionar 10mL de la solución de glucosa al 10%. Agitar y distribuir 2mL en tubos de ensayo previamente esterilizados. Preparar 2 tubos por cada cepa.

c) Requerimiento de sal:

- 1.- Medio Basal, formulación para 1 Litro:

Bactopeptona	5g
Extracto de levadura	1g
Cloruro Férrico al 1%	1mL

NaCl 0%	0g
NaCl 6%	60g
NaCl 8%	80g

Bacto agar	13g
Agua destilada	1 L

pH 7.6

- 2.- Calentar hasta que el agar se disuelva completamente.
- 3.- Esterilizar durante 15 minutos.
- 4.- Cuando se encuentre tibio servir en cajas Petri.

d) Crecimiento en medio TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa):

- 1.- Suspender 89g del medio en 550mL de agua destilada.
- 2.- Aforar a 1L con agua de mar, previamente filtrada a 0.2µm y esterilizada.
- 3.- Ajustar el pH a 8.1
- 4.- Calentar hasta que el agar se disuelva (No esterilizar).
- 5.- Cuando se encuentre tibio verter en cajas Petri.

e) Crecimiento en medio McConkey:

- 1.- Suspender 50g de medio en 460mL de agua destilada
- 2.- Aforar a 1L con agua de mar, previamente filtrada a 0.2µm y esterilizada.
- 4.- Calentar hasta que el agar se disuelva (No esterilizar).
- 5.- Cuando se encuentre tibio verter en cajas Petri.

Preparación de reactivos para pruebas bioquímicas

Oxidasa:

- 1.- Preparar una solución de dimethyl-para-phenylenediamine hydrochloride al 1%

(0.1g de reactivo en 10mL de agua destilada). Preparar el mismo día de su uso, no refrigerar por más de una semana.

Catalasa:

- 1.- Preparar una solución de peróxido de hidrógeno al 3%.

(0.3mL de H₂O₂ en 9.7mL de agua destilada.)

Protocolos para la realización de pruebas bioquímicas

Prueba oxidasa:

En una tira de papel filtro (Whatman No 1 o equivalente) colocar una colonia de muestra bacteriana con un pica-dientes de madera estéril (no usar asa de fierro porque puede dar falsos positivos). Adicionar una gota de la solución dimetyl-para-phenylenediamine hydrochloride al 1%.

Catalasa:

Colocar una colonia en un portaobjetos con un asa estéril y adicionar una o dos gotas de solución de peróxido de hidrogeno (3%). La formación de burbujas es indicativo de una reacción positiva.

Movilidad:

Inocular por picadura un tubo con medio sólido e incubar a temperatura entre 26 y 29°C por 5 a 7 días. Crecimiento difuso a través del medio en la línea de inoculación es considerado como positivo.

Oxidación -Fermentación:

Inocular por picadura 2 tubos con medio Ox-Fer. Adicionar alrededor de 300µL de aceite mineral a uno de los tubos inoculados (tubo cerrado). Incubar a temperatura entre 26 y 29°C por 5 ó 7 días y realizar la lectura.

Se considera reacción positiva si hay un cambio de color de rojo a amarillo en ambos tubos, además registrar si hay presencia de gas (burbujas) o resquebrajamiento de agar.

El tipo de metabolismo se define de la siguiente manera:

Oxidativo: Es una reacción ácida (cambio de color a amarillo) en el tubo sin aceite mineral (abierto) y no hay crecimiento o muy ligero en el tubo cerrado (aceite mineral).

Fermentativo: Es una reacción ácida (cambio de color a amarillo) en los dos tubos (abierto y cerrado).

Organismo que no oxida o fermenta la glucosa no hay cambio en el tubo cerrado y, una reacción alcalina en el tubo abierto.

Sensibilidad al 0/129 (10 y 150µg/mL):

Estriar una región de la caja con antibiótico 0/129 con la cepa bacteriana. Se considera reacción positiva (sensible) cuando no hay crecimiento bacteriano o significativamente menor al control sin 0/129.

Requerimiento de sal:

Estriar una región de las cajas con diferentes concentraciones de sal. Crecimiento bacteriano es considerado como positivo.

Crecimiento en TCBS:

Estriar una cepa bacteriana en una región de la caja con medio TCBS, registrar si hay crecimiento y la coloración de la cepa. Si la colonia es de color amarillo fermenta la sacarosa, si las colonias son verdes no fermentan la sacarosa.

Crecimiento en MacConkey:

Estriar una cepa bacteriana en una región de la caja de medio MacConkey, registrar si hay crecimiento y la coloración de la cepa. Si la colonia es rosa es fermentadora de lactosa, si las colonias son blancas no son fermentadoras de lactosa.

Protocolo de Tinción de Gram:

- 1.- Tomar un portaobjetos limpio y agregar una gota de agua destilada.
- 2.- Con un asa de inoculación tomar una colonia bacteriana y realizar un frotis en el portaobjetos con la gota de agua.
- 3.- Fijar la muestra al calor, pasando varias veces el portaobjeto sobre la flama del mechero, evitado que se sobrecaliente.
- 4.- Inundar la muestra con el colorante Cristal Violeta durante 1 minuto, posteriormente enjuagar con abundante agua y escurrir.
- 5.- Inundar la muestra con el colorante Lugol o Iodine (yodo-yoduro) durante 1 minuto, enjuagar con abundante agua y escurrir.
- 6.- Inundar la muestra con alcohol-acetona durante 15 segundos, enjuagar con abundante agua y escurrir.
- 7.- Inundar la muestra con el colorante Safranina durante 1 minuto, enjuagar con abundante agua y escurrir.
- 8.- Observar al microscopio compuesto con los objetivos de 10, 40 y 100X. Las bacterias Gram negativas se tiñen de rojo-rosa, y las Gram positivas de azul-morado.

Protocolo de Criopreservación:

- 1.- En un microtubo de 1.6mL estéril adicionar 1mL de la cepa bacteriana pura a una concentración de 10^7 células por mililitro.
- 2.- Agregar 400 μ L de glicerol estéril.
- 3.- Agitar bien el tubo hasta que el glicerol se mezcle perfectamente, de preferencia dar vortex por 1 minuto o hasta observar que el glicerol esté bien mezclado.
- 4.- Etiquetar con plumón indeleble y guardar los tubos a -80°C.

Anexo II

Protocolos de Biología Molecular

Extracción del DNA genómico Bacteriano

La extracción del DNA se realizó con el kit "*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*" (NA2120) de Sigma-Aldrich.

1. Colectar las células una vez de haber crecido en medio de cultivo durante toda la noche y centrifugar por 2 minutos entre 12,000 - 16,000 x *g*. Retirar el sobrenadante y tirar.
2. Resuspender el pelet en 180µL de la solución de lisis T (B 6678).
3. Si se desea tener DNA libre de RNA agregar 20µL de la solución de RNasa A (R 6148) y mezclar, incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar 20µL de Proteinasa K (20mg/mL), mezclar bien e incubar por 30 minutos a 55°C.
5. Agregar 200µL de la solución de lisis C (B 8803), dar vortex durante 15 segundos e incubar a 55°C durante 10 minutos. Es esencial una mezcla homogénea.
6. Preparar las columnas de unión de DNA en tubos de 2mL (C 9471) agregando 500µL de la solución para preparar columnas (C 2112) en cada tubo. Centrifugar a 12,000 x *g* por 1 minuto y desechar lo eluido, es decir, lo que se colectó en el tubo de 2mL.
7. Agregar 200µL de etanol (95-100%) a la muestra y mezclar bien por vortex entre 5 y 10 segundos.
8. Transferir toda la muestra del paso 7 en un tubo con una columna ya preparada. Centrifugar a ≥ 6500 x *g* durante 1 minuto. Desechar lo eluido y colocar la columna en un tubo nuevo de 2mL.
9. Agregar 500µL de la solución de lavado 1 (W 0263) a la columna y centrifugar por 1 minuto a $\geq 6,500$ x *g*. Desechar lo eluido y colocar la columna en un tubo nuevo de 2mL.
10. Antes de realizar este paso, prepare una segunda solución de lavado diluyendo la solución de lavado concentrado (B 6553) con etanol. Una vez preparada, agregar 500µL de la solución a la columna y centrifugar durante 3 minutos a velocidad máxima (12,000 – 16,000 x *g*). La columna debe de estar libre de etanol para continuar. Centrifugue durante 1 minuto a velocidad máxima. Descarte el tubo y coloque la columna en un tubo de 2mL nuevo.
11. Agregar 200µL de la solución para eluir (B 6803) directamente en el centro de la columna. Centrifugue durante 1 minuto a $\geq 6,500$ x *g* para eluir el DNA. Realice una segunda elusión agregando 200µL a la columna y centrifugue de nuevo.
12. Almacenar el DNA a -20°C.

Preparación de geles de agarosa al 1%.

- 1.- Disolver 0.3g de agar (grado Biología Molecular) en 30mL de agua destilada.
- 2.- Calentar hasta que el agar se disuelva.
- 3.- Esperar a que se enfría un poco y adicionar 3µL de SYBR Green (10,000X).
- 4.- Disolver bien y servir en la cámara de electroforesis.
- 5.- Esperar de 30 a 40 minutos para que solidifique bien.

Electroforesis de geles de agarosa al 1%.

- 1.- Colocar el gel dentro de la cámara de electroforesis con buffer TAE 0.5X (ver buffers).
- 2.- Con una micropipeta de 10µL cargar de 4 a 6µL del DNA y/o productos de PCR y 2µL de azul de bromofenol.
- 3.- Correr el gel a un voltaje de 80 volts durante 40 minutos.
- 4.- Al terminar, retirar el gel de la cámara y observar en un transiluminador de luz UV.

Condiciones de PCR del gen ribosomal 16S.

Preparación de reactivos para 1 reacción de PCR.

Buffer 5X -----	5µL
dNTP's 10mM -----	0.5µL
50mM MgCl ₂ -----	0.75µL
Primer Forward -----	0.8µL
Primer Reverse -----	0.8µL
DNA genómico -----	1µL (2µL)
DNA polimerasa <i>Tfi</i> (invitrogen, 30342-011) -----	0.5µL
Agua desionizada -----	15.65µL
Total -----	25µL

Purificación de fragmentos de PCR.

La purificación de los fragmentos de PCR se realizo mediante el uso del kit "PureLink Quick Gel Extraction kit" (K2100-12) de Invitrogen.

1. Cortar la banda del gel deseada y determinar su peso mediante el uso de una balanza analítica. Posteriormente colocar el fragmento del gel en un tubo de 1.6mL.
2. Agregar 1.2mL de la solución buffer para solubilizar geles (L3) por cada 400mg de gel.

3. Calentar el tubo a 50°C durante 10 min, invirtiendo el tubo cada 3 minutos para disolver el gel.
4. Transferir la solución a una columna del kit previamente colocado en un tubo de 1.6mL.
5. Centrifugar a velocidad de 12,000 x *g* durante 1 minuto.
6. Agregar de 500 a 700µL del buffer de lavado (W1) que contiene etanol y centrifugar a velocidad máxima de 12,000 x *g* durante 1 min, y descartar lo colectado en el tubo.
7. Centrifugar de nuevo durante 2-3 minutos a velocidad máxima para eliminar residuos de alcohol y colocar la columna en un tubo nuevo de 1.6mL.
8. Agregar 50µL del buffer de elución (E5) en el centro de la columna e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a velocidad máxima de 12,000 x *g* por 1 min.
10. Almacenar el DNA purificado a -20°C.

Literatura Citada

- Abbott SL, Cheung WKW, y Janda JM. 2003. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions and Phenotypic identification schemes. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2348 – 2357.
- Achtman M, y Wagner M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Rev. Microbiol.* **6**, 431 – 440.
- Alonso C, Warnecke F, Amann R, y Pernthaler J. 2007. High local and global diversity of *Flavobacteria* in marine plankton. *Environ. Microbiol.* **9**, 1253 – 1266.
- Alsina M, y Blanch AR. 1994a. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Applied Bacteriology.* **76**, 79 – 85.
- Alsina M, y Blanch AR. 1994b. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *J. Applied Bacteriology.* **77**, 719 – 721.
- Anderson AA y Epifanio CE. 2009. Induction of metamorphosis in the Asian shore crab *Hemigrapsus sanguineus*: characterization of the cue associated with biofilm from adult habitat. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **382**, 34 – 39.
- Annamalai N, Giji S, Arumugam M, y Balasubramanian T. 2010. Purification and characterization of chitinase from *Micrococcus* sp. AG84 isolated from marine environment. *Afr. J. Microbiol. Res.* **4**, 2822 – 2827.
- Bakun A. Patterns in the Ocean. 1996. Ocean processes and marine population dynamics. California Sea Grant College System. 44 p.
- Bassim KM, y Sammarco PW. 2003. Effects of temperature and ammonium on larval development and survivorship in an scleractinian coral (*Diploria strigosa*). *Mar. Biol.* **142**, 241–252.
- Boettcher, AA. 2005. Heath sock induced metamorphosis of the queen conch, *Strombus gigas*: comparison with induction by algal associated cues. *J. Shell. Resch.* **24**, 1123 – 1126.
- Botello, G. y Krug, P. J. 2006. ‘Desperate larvae’ revisited: age, energy and experience affect sensitivity to settlement cues in larvae of gastropod *Alderia* sp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **312**, 149 – 159.
- Buckley D, y Schmidt T. 2002. Exploring the biodiversity of soil – A microbial rain forest, p. 183-208. In J. Staley and A. Reysenbach (ed.), *Biodiversity of Microbial Life*. Hohn Wiley and Sons, New York.
- Byrne MHM, Selvakumaraswamy P, Nguyen HD, Dworjanyn SA, y Davis AR. 2009. Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. *Proc. of the Royal Soc.* **276**, 1883-1888.
- Carpizo-Ituarte E, Salas-Garza A, y Parés-Sierra G. 2002. Induction of metamorphosis with KCl in three species of sea urchins and its implications in the production of juveniles. *Ciencias Marinas* **28**, 157-166.

- Checkley Jr, y Barth DM. 2009. Patterns and processes in the California Current System. Prog. Oceanogr. doi: 10.1016/j.pocean.2009.07.028.
- Chen CP, y Chen BY. 1992. Effects of high temperature on larval development and metamorphosis of *Arachnoides placenta* (Echinodermata: Echinoidea). Mar. Biol. **112**, 445 – 449.
- Chiu JMY, Thiyagarajan V, Pechenik JA, Hung OS, y Qian PY. 2007. Influence of bacteria and diatoms biofilms on metamorphosis of the marine slipper limpet *Crepidula onix*. Mar. Biol. **151**, 1417 – 1431.
- Clarke A, y Fraser KPP. 2004. Why does metabolism scale with temperature?. Functional Ecology. **18**, 243-251.
- Costerton WJ, y Wilson M. 2004. Introducing Biofilms. Biofilms. **1**, 1 – 4.
- Cowen RK. 1983. The effect of sheephead (*Semicossyphus pulcher*) on red sea urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*) populations: An experimental analysis. Oecologia (Berlin) **58**, 249 – 255.
- Crump BC, Hopkinson CS, Sogin ML y Hobbie JE. 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: Combined influences of bacterial growth and residence time. Appl. Environ. Microbiol. **70**, 1494 – 1505.
- Díaz-Pérez L. 2006. Inducción a la metamorfosis en larvas del erizo blanco *Lytechinus pictus* (Verrill 1867), mediante biopelículas y caracterización bioquímica de las cepas aisladas. Tesis de Maestría en Ciencias en Oceanografía Costera, Universidad Autónoma de Baja California, 95 pp.
- Drobretsov S, y Qian PY. 2006. Facilitation and inhibition of larval attachment of bryozoans *Bugula neritina* in association with mono-species and multi-species biofilms. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **333**, 263 – 274.
- Du H, Jiao N, Hu Y, y Zeng Y. 2006. Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments. FEMS Microbiol. Ecol. **57**, 92 – 105.
- Du Z, Zhang W, Xia H, Lü G, y Chen G. 2010. Isolation and diversity of heterotrophic bacteria associated with sea anemones. Acta Oceanologica Sinica. **29**, 62 – 69.
- Dumontet S, Krovacek K, Svenson SB, Pasquale V, Baloda SB, y Figliuolo G. 2000. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of southern Italy. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Diseases. **23**, 53 – 72.
- Dworjanyn SA, y Pirozzi I. 2008. Induction of settlement in the sea urchin *Tripneustes gratilla* by macroalgae, biofilms and conspecifics: A role for bacteria?. Aquaculture. **274**, 268 – 274.
- Elkin C, y Marshall DJ. 2007. Desperate larvae: influence of deferred cost and habitat requirements on habitat selection. Mar. Ecol. Prog. Ser. **335**, 143-153.
- Ettema TJG, y Andersson SGE. 2009. The α -proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. Biol. Lett. **5**, 429 – 432.
- Farmanfarmanian A, y Giese AC. 1963. Thermal tolerance and acclimatation in the western purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Physiol. Zool. **36**, 237-343.

- Fedorov AV, y Philander SG. 2000. Is El Niño changing?. *Science*. **288**, 1997 - 2001.
- Ferguson DM, Moore DF, Getrich MA, y Zhouandai MH. 2005. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 598 – 608.
- Fierer N y Jackson R. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 626 – 631.
- Fry J. 2000. Bacterial diversity and “unculturables”. *Microbiology Today*. **27**, 186 – 188.
- Gallardo CS y Sanchez KA. 2001. Induction of metamorphosis and its effect on the growth and survival of postmetamorphic juveniles of *Chorus giganteus* (Gastropoda: Muricidae). *Aquaculture*. **201**, 241 – 250.
- Gay M, Renault T, Pons AM, y Le Roux F. 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Org.* **62**, 65 – 64.
- Gebauer P, Paschke K, y Anger K. 2003. Delayed metamorphosis in decapod crustaceans: evidence and consequences. *Revista Chilena de Historia Natural*. **76**, 169-175.
- Gephardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*, ASM Press Washington D.C.
- Gilles Kw, y Pearse JS. 1986. Disease in sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus*: experimental infection and bacterial virulence. *Dis. Aquat. Org.* **1**, 105 – 114.
- Giménez, L. 2006. Phenotypic links in complex life cycles: conclusions from studies with decapods crustaceans. *Integ. Comp. Biol.* **46**, 615-622.
- Gómez-León J, Villamil L, Lemos ML, Novoa B, y Figueras A. 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet Shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl. Env. Microbiol.* **71**, 98 – 104.
- Gontang EA, Fenical W, y Jensen PR. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Env. Microbiol.* **73**, 3272 – 3282.
- González JM, y Moran AM. 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class *Proteobacteria* in coastal sea water. *Appl. Env. Microbiol.* **63**, 4237 – 4242.
- González-Lozano CP. 2010. Estrés térmico durante el desarrollo ontogenético del erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*). Tesis de maestría en ecología molecular y biotecnología. Universidad Autónoma de Baja California. pp. 61.
- Gow JA. 1992. Sodium-ion dependence in marine gram-negative. In tested studies for laboratory teaching, Volume 6 (C.A. Goldman, S.E. Andrews, P.L. Hauta, and R. Ketchum, Editors). Proceeding of the 6th workshop/conference for Biology Laboratory Education (ABLE), 161 p.
- Gribben PE, Wright JT, O'Connor WA, y Steinberg P. 2009. Larval settlement preference of a native bivalve: the influence of an invasive alga versus native substrata. *Aquat. Biol.* **7**, 217 – 227.

- Gunn BA, y Colwel RR. 1983. Numerical taxonomy of *Sthapyloccocci* isolated from the marine environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 751 – 759.
- Hadfield MG. 2011. Biofilms and marine invertebrate larvae: What bacteria produces that larvae use to choose settlement sites. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **3**, 453 – 470.
- Hadfield MG, y Paul VJ. 2001. Chapter 13: Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine-invertebrate larvae. *Mar. Chem. Ecol.* CRC Press Publications.
- Hammond LM, y Hofmann, GE. 2010. Thermal tolerance of *Strongylocentrotus purpuratus* early life history stages: mortality, stress-induced gene expression and biogeographic patterns. *Mar Biol.* **157**, 2677 – 2687.
- Harakeh S, Yassine H, y El-Fadel M. 2006. Antimicrobial-resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from the Lebanese environment. *Mar. Env. Res.* **62**, 181 – 193.
- Harder T, Lam C, y Qian PY. 2002. Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by marine biofilms: an investigation of monospecific diatom as settlement cues. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **229**, 112 – 121.
- Harley CDG, Hughes AR, Hultgren KM, Miner BG, Sorte CJB, Thornber CS, Rodriguez LF, Tomanek L, y Williams SL. 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecol. Lett.* **9**, 228 – 241.
- Hayashi K, Moriwaki J, Sawabe T, Thompson FL, Swing J, Gudkovs N, Christen R, y Ezura Y. 2003. *Vibrio superstes* sp. Nov., isolated from the gut of Australian abalones *Haliotis laevigata* and *Haliotis rubra*. *Int. J. Sys. Evo. Microbiol.* **53**, 1813 – 1817.
- Hedlund BP, y Staley JT. 2001. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **51**, 61 – 66.
- Helmuth B. 2002. How do we measure the environment? Linking intertidal thermal physiology and ecology through biophysics. *Integ. Comp. Biol.* **42**, 837-845.
- Helmuth B, Broitman BR, Blanchette CA, Gilman S, Halpin, Harley CDG, O'Donnell MJ, Hofmann GE, Menge B, y Strickland D. 2006. Mosaic patterns of thermal stress in the rocky intertidal zone: implications for climate change. *Ecol. Monog.* **76**, 461-479.
- Hentschel U, Schmid M, Wagner M, Fieseler L, Gernert C, y Hacker J. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**, 305 – 312.
- Hereu B, Zabala M, Linares C, y Sala E. 2004. Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. *Mar. Biol.* **144**, 1011 – 1018.
- Hernández de la Torre B, Gaxiola-Castro G, y Nájera-Martínez S. 2004. Efectos del ENSO en la producción primaria frente a Baja California. *Ciencias Marinas.* **30**, 427 – 441.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT y Williams ST. 2004. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9na Edicion. Lippincott Williams and Wilkins Impressions.
- Horner-Devine MC, Carney KM, y Bohannon BJM. 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc. R. Soc. London, Ser. B.* **271**, 113 – 122.

- Huang S, y Hadfield MG. 2003. Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. Mar. Ecol. Prog. Ser. **260**, 161 – 172.
- Huang S, Dobretsov S, Xiong H, y Qian PY. 2007. Effect of biofilm formation by *Pseudoalteromonas spongiae* on induction of larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. Appl. Environ. Microbiol. **73**, 6284 – 6288.
- Huggett MJ, Williamson JE, de Nys R, Kjelleberg S, y Steingber P. 2006. Larval settlement of the common Australian sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* in response to bacteria from the surface of coralline algae. Oecologia. **149**, 604 – 619.
- Huys L, Derth P, Robles R, Ollevier F, Sorgeloos P, y Swings J. 2001. Search for beneficial bacteria strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. Aquaculture. 25 – 37.
- Ivanova EP, Kiprianova EA, Mikhailov V, Levanova GF, Garagulya AD, Gorshkova NM, Yumoto N, y Yoshikawa S. 1996. Characterization and identification of marine *Alteromonas nigrifaciens* strains and emendation of the description. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**, 223 – 228.
- Ivanova EP, Romanenko LA, Matté MH, Matté JR, Lysenko AM, Simidu U, Kita-Tsukamoto K, Sawabe T, Vysotskii MV, Frolova GM, Mikhailov V, Christen R, y Colwell RR. 2001. Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu *et al.* 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. nov. and enmendation of description. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. **51**, 1071 – 1078.
- Ivanova EP, Gorshkova NM, Sawabe T, Zhukova V, Hayashi K, Kurilenko V, Alexeeva Y, Buljan V, Nicolau DV, Mikhailov VV, y Christen R. 2004. *Sulfitobacter delicatus* sp. nov. and *Sulfitobacter dubius* sp. nov., repectively from starfish (*Stellaster equestris*) and sea grass (*Zostera marina*). Int. J. Syst. Evo. Microbiol. **54**, 475 – 480.
- Jackson D, Lyes SP, Hinman VF, Woods R, Lavin M, y Degnan BM. 2002. Ecological regulation of development: induction of marine invertebrate metamorphosis. Int. J. Dev. Biol. **46**, 679 – 686.
- Jensen PR, y Fenical W. 1993. The relative abundance and seawater requirements of Gram-Positive bacteria in near-shore tropical marine samples. Microb. Ecol. **29**, 249 – 257.
- Johnson LG, y Babcock RC. 1994. Temperature and the larval ecology of the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster placi*. Biol. Bull. **187**, 304–308.
- Joint I, Mühling M, y Querellou J. 2010. Culturing marine bacteria – an essential prerequisite for biodiscovery. Microbial Biotechnology. **3**, 564 – 575.
- Jung S-Y, Jung Y-T, Oh T-K, y Yoon J-H. 2007. *Photobacterium lutimaris* sp. nov. isolated from a tidal flat sediment in Korea. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. **57**, 332 – 336.
- Karl DM. 2002. Microbiological oceanography - hidden in a sea o microbes. Nature. **415**, 590 – 591.
- Kato S y Schroeter SC. 1985. Biology of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, and its fishery in California. Mar. Fish. Rev. **47**, 1 – 20.

- Kassen R, and Rainey PB. 2004. The ecology and genetics of microbial diversity. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 207 – 231.
- Kaye JZ, Sylvan JB, Edwards KJ, y Baross JA. 2011. *Halomonas* and *Marinobacter* ecotypes from hydrothermal vent, seafloor, and deep-sea environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**, 123 – 133.
- Khandeparker L, Anil AC, y Raghukumar S. 2006. Relevance of biofilm bacteria in modulating the larval metamorphosis of *Balanus amphitrite*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**, 425 – 438.
- Khudary RA, Stöber NI, Qoura F, y Antranikian G. 2008. *Pseudoalteromonas ártica* sp. nov. aerobic, psychrotolerant, marine bacterium isolated from Spitzbergen. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **58**, 2018 – 2024.
- Kusuda R, Kawai K, Salati F, Banner CR, y Fryer JL. 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 406 – 409.
- Kuo ESL, y Sanford E. 2009. Geographic variation in the upper thermal limits of an intertidal snail: implications for climate envelope models. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **388**, 137 – 146.
- Kvitt H, y Colorni A. 2004. Strain variation and geographic endemism in *Streptococcus iniae*. *Dis. Aquat. Org.* **61**, 67 – 73.
- Labrenz M, Tindall BJ, Lawson PA, Collins MD, Schumann P, y Hirsch P. 2000. *Staleyia guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., α -3-Proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic Antarctic Ekho Lake. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **50**, 303 – 313.
- Latif M, y Keenlyside NS. 2008. El Niño/Southern Oscillation response to global warming. *PNAS early edition*. doi: 10.1073/pnas.0710860105. 1 – 6.
- Lau SCK, y Qian PY. 1997. Phlorotannins and related compounds as larval settlement inhibitors of a tube-building polychaete *Hydroides elegans* (Haswell). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **159**, 219 – 227.
- Lau SCK, y Qian PY. 2001. Larval settlement in the serpulid polychaete *Hydroides elegans*, in response to bacterial biofilms: an investigation of the nature of putative larval settlement cue. *Mar. Biol.* **138**, 321-328.
- Lau SCK, Mak KKW, Chen F y Qian PY. 2002. Bioactivity of bacterial strains isolated from marine biofilms in Hong Kong waters for the induction of larval settlement in the marine polychaete *Hydroides elegans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **226**, 301 – 310.
- Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, y Marinelli F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek.* **78**, 399 – 405.
- Lebranz M, Tindall EJ, Lawson PA, Collins MD, Schumann P, y Hirsch P. 2000. *Staleyia guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., α -3-proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake. *Int. J. Syst. Evo. Microbiol.* **50**, 303 – 313.

- Li ZY, He LM, Wu J, y Jiang Q. 2006. Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the south China sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **329**, 75 – 85.
- Lijima S, Washio K, Okahara R, and Morikawa M. 2009. Biofilm formation and proteolytic activities of *Pseudoalteromonas* bacteria that were isolated from fish farm sediments. *Microbial Biotech.* **2**, 361 – 369.
- Loch TP, y Faisal M. 2010. Isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* from Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) inhabiting lakes Michigan and Huron. *J. Great Lakes Research.* **36**, 13 – 17.
- Lynn RJ. 1987. The California Current System: The seasonal variability of its physical characteristics. *J. Geophysical Research.* **92**, 12.947 – 12.966.
- MacLeod R. 1965. The question of the existence of specific marine bacteria. *Bacteriological Review.* **29**, 9 – 23.
- Martínez-Picado J, Alsina M, Blanch AR, Cerda M, y Jofre J. 1996. Species-specific detection of *Vibrio anguillarum* in marine aquaculture environments by selective cultures and DNA hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 443 – 449.
- Martins ML, Mouriño JLP, Fezer GF, Buglione Neto CC, Garcia P, Silva BC, Jatobá A, y Vieira FN. 2010. Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. *Braz. J. Biol.* **70**, 205 – 209.
- McArthur JV. 2006. *Microbial ecology: an evolutionary approach*. Elsevier, Boston.
- Muroga K, Higashi M, y Keitoku H. 1987. The isolation of instestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture.* **65**, 79 – 88.
- Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Jonhson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, y Lynfield R. 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA.* **290**, 2976 – 2984.
- Nakamura LK, Roberts MS, y Cohan FM. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int. J. Sys. Bact.* **49**, 1211 – 1215.
- Nam Y-D, Chang H-W, Park JR, Kwon H-Y, Quan Z-X, Park Y-H, Lee J-S, Yoon J-H, y Bae J-W. 2007. *Pseudoalteromonas marina* sp. nov. a marine bacterium isolated from tidal flats of the Yellow Sea, and reclassification of *Pseudoalteromonas sagamiensis* as *Algicola sagamiensis* comb. nov. *Int. J. Sys. Evo. Microbiol.* **57**, 12 – 18.
- Negri AP, Webster NS, Hill RT, y Heyward. 2001. Metamorphosis of broadcast spawning corals in response to bacteria isolated from crustose algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **223**, 121 – 131.
- Nishizaki MT, y Acherman DJ. 2006. Juvenile-adult associations in sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. droebachiensis*): protection from predation and hydrodynamics in *S. franciscanus*. *Mar. Biol.* **151**, 135 – 145.

- Olafsen JA, Mikkelsen HV, Gjaever HM, y Hansen GH. 1993. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1848 – 1854.
- Olafsen JA. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture.* **200**, 223 – 247.
- Oliver JD, 1982. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. *Deep-sea Research.* **29**, 795 – 798.
- Osovitz CJ, y Hofmann GE. 2005. Thermal-history dependent expression of *hsp70* gene in the purple sea urchins: Biogeographic patterns and the effect of thermal acclimation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **327**, 134 – 143.
- Palacios-Hernandez E, Argote-Espinosa ML, Amador-Buenrostro A, y Mancilla-Perasa M. 1996. Simulación de la circulación barotrópica inducida por viento en Bahía Sebastian Vizcaino, B.C. *Atmosfera.* **9**, 171 – 188.
- Palleiro-Nayar JS, Salgado-Rogel ML, y Aguilar-Montero D. 2008. La pesca de erizo morado, *Strongylocentrotus purpuratus*, y su incremento poblacional en Baja California, México. *Ciencia Pesquera.* **16**, 29 – 35.
- Palleiro-Nayar JS. 2009. Análisis poblacional del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* en la costa occidental de la península Baja California. Puede considerarse una metapoblación?. Tesis de Doctorado en Ecología Marina. CICESE. pp. 129.
- Palleiro-Nayar JS, Sosa-Nishisaky O, y Montaña-Moctezuma G. 2011. Importancia del sustrato y la presencia de adultos en el reclutamiento del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* en Baja California. *Ciencias Marinas,* **37**, 59 – 70.
- Parker LM, Ross PM, y O' Connor WA. 2009. The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). *Global Change Biology.* **15**, 2123-2136.
- Pearce JR, y Scheibling RE. 1991. Effect of macroalgae, microbial films, and conspecifics on the induction of metamorphosis of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **147**, 147 – 162.
- Pechenick JA. 1990. Delayed metamorphosis by larvae of benthic marine invertebrates. Does it occur? Is there a price to pay?. *Ophelia.* **32**, 63 – 94.
- Pechenick JA. 2006. Larval experience and latent effects – metamorphosis is not a new beginning. *Integ. Comp. Biol.* **46**, 323-333.
- Peraza MM, Palacios-Hernandez E, y Castillo GL. 1993. Hydrographic variability in Bahía Vizcaino, Baja California, Mexico. *Ciencias Marinas.* **19**, 265 – 284.
- Pineda J, y Lopez M. 2002. Temperature, stratification and barnacle larval settlement in two California sites. *Continental Shelf Research.* **22**, 1183 – 1198.
- Pommier T, Pinhassi J, y Hagström A. 2005. Biogeographic analysis of ribosomal RNA clusters from marine bacteroplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* **41**, 79 – 89.

- Pörtner HO. 2008. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **373**, 203 – 217.
- Putnam HM, Edmunds PJ, y Fan TY. 2008. Effect of temperature on settlement choice and photophysiology of larvae from the Reef Coral *Stylophora pistillata*. *Biol. Bull.* **215**, 135 – 142.
- Qian P. Y. y Pechenick J. A. 1998. Effects of larval starvation and delayed metamorphosis on juvenile survival and growth of the tube-dwelling polychaete *Hydroides elegans* (Haswell). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **227**, 169-185.
- Qian PY, Thiyagarajan V, Lau SCK, y Cheung SCK. 2003. Relationship between bacterial community profile in biofilm and attachment of the acorn barnacle *Balanus amphitrite*. *Aquat. Microb. Ecol.* **33**, 225 – 237.
- Raguénès GHC, Peres A, Ruimy R, Pignet P, Christen R, Loaec M, Rougeaux H, Barbier G, y Guezennec JG. 1997. *Alteromonas infernus* sp. nov. a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 422 – 430.
- Rahman S, Tsuchiya M, y Uehara T. 2009. Effects of temperatura on hatching rate, embryonic development and early larval survival of the edible sea urchin, *Tripneustes gratilla*. *Biologia.* **64**, 768 – 775.
- Raj ST, Lipton AP, y Chauhan GS. 2010. Characterization and infectivity evaluation of *Vibrio harveyi* causing white patch disease among captive reared seahorses, *Hippocampus kuda*. *Indian Journal of Marine Sciences.* **39**, 151 – 156.
- Randall CJ, y Szmant AM. 2009. Elevated temperature reduced survivorship and settlement of the larvae of the Caribbean scleritian coral, *Flavia fragum* (Esper). *Coral Reefs.* **28**, 537 – 545.
- Reichelt JL, y Baumann P. 1974. Effect of sodium chloride on growth of heterotrophic marine bacteria. *Arch. Microbiol.* **97**, 329 – 345.
- Riesenfeld CS, Schloss PD, y Handelsman J. 2004. Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 525 – 552.
- Rodriguez RA, y Epifanio CE. 2000. Multiple cues for induction of metamorphosis in larvae of the common mud crab *Panopeus herbstii*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **195**, 221 – 229.
- Rogers-Bennett, Bennett LW, Fastenau C, y Dewees CM. 1995. Spatial variation in red sea urchin reproduction and morphology: implications for harvest refuge. *Ecol. Appl.* **5**, 1171 – 1180.
- Rohwer F, Breitbart M, Jara J, Azam F, y Knowlton N. 2001. Diversity of bacteria associated with the charibbean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reefs.* **20**, 85 – 91.
- Rohwer F, Seguritan V, Azam F, y Knowlton N. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **243**, 1 – 10.
- Romanenko LA, Uchino M, Tebo BM, Tanaka N, Frolova GN, y Mikhailov V. 2008. *Pseudomonas marincola* sp. nov., isolated from marine environments. *Int. J. Sys. Evo. Microbiol.* **58**, 706 – 710.

- Romano LA, y Mejía J. 2003. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y humanos. *Revista AquaTIC*. **18**, 25 – 32.
- Rosenberg E, y Ben-Halm Y. 2002. Microbial diseases of coral and global warming. *Environ. Microbiol.* **4**, 318 – 326.
- Roughgarden J, Gaines S, Possingham H. 1988. Recruitment dynamics in complex life cycles. *Science*. **241**, 1460 – 1466.
- Saitou N y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406 – 425.
- Salas HJ. 2000. Historia y aplicación de normas microbiológicas de calidad de agua en el medio marino. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS). OPS-OMS. Hojas de divulgación técnica. **29**, 1 – 11.
- Salgado-Rogel ML, y Palleiro-Nayar JS. 2008. Disminución de la abundancia del erizo rojo y propuestas para su manejo en Baja California, México. *Ciencia Pesquera*. **16**, 37 – 45.
- Salka I, Moulisová V, Koblížek M, Jost G, Jürgens K, y Labrenz M. 2008. Abundance, Depth distribution, and composition of aerobic bacteriochlorophyll *a*-producing bacteria in four basins of the central Baltic Sea. *Appl. Env. Microbiol.* **74**, 4398 – 4404.
- Santiago-González M. 2008. Películas bacterianas asociadas a la presencia de adultos de erizo morado “*Strongylocentrotus purpuratus*”, en pozas intermareales de la costa oeste de Baja California. Tesis de Maestría en Oceanografía Costera. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada Baja California, México. pp. 80.
- Saunders MI, y Metaxas A. 2009. Effects of temperature, size and food on the growth of *Membranipora membranacea* in laboratory and field studies. *Mar. Biol.* **156**, 2267 – 2276.
- Sawabe T, Tanaka R, Iqbal MM, Tajima K, Ezura Y, Ivanova EP, y Christen R. 2000. Assignmet of *Alteromonas elyakovii* KMM 162^T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *Int. J. Syst. Evo. Microbiol.* **50**, 265 – 271.
- Shikuma NJ, y Hadfield MG. 2006. Temporal variation of and initial marine biofilm community and its effects on larval settlement and metamorphosis of the tubeworm *Hydroides elegans*. *Biofilms*. **2**, 231 – 238.
- Spiers AJ, Buckling A, y Rainey PB. 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*. **146**, 2345 – 2350.
- Somero GM. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: Optima, limits, and cost of living. *Integ. and Comp. Biol.* **42**, 780-789.
- Somero GM. 2011. Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **301**: R1–R14, 2011.
- Sorokin DY. 1995. *Sulfitobacter ponticus* gen. nov. sp. nov. – a new heterotrophic bacterium from the Black Sea, specialized on sulfite oxidation. *Mikrobiologiya*. **64**, 354 – 365 (English translation, 295 – 305).

- Stabili L y Cavallo RA. 2004. Biodiversity of culturable heterotrophic bacteria in the southern Adriatic sea Italian coastal waters. *Scienta Marina*. **68**, 31 – 41.
- Stach JEM, y Bull AT. 2005. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **87**, 3 – 9.
- Steneck RS, Graham MH, Bourque BJ, Corbett D, Erlandson JM, Estes JA, y Tegner MJ. 2002. Kelp forest ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. *Env. Conser.* **29**, 436 – 459.
- Strathmann MF. 1987. Phylum Echinodermata: Class Echinoidea. In: M. F. Strathmann, (ed), *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast*. Univ. of Washington Press, Seattle Washington, pp. 511 – 534.
- Streit WR, y Schmitz RA. 2004. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*. **7**, 492 – 498.
- Suanyuk N, Sukkasame N, Tanmark N, Yoshida T, Itami T, Thune RL, Tantikitti C, y Supamattaya K. 2010. *Streptococcus iniae* infection in culture Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* **32**, 341 – 348.
- Suenada K, Hori H, Ishida H, Nukaya H, Roberts RD, y Tsuji K. 2004. Inducing substance for abalone larval metamorphosis from the crustose coralline alga *Hydrolithon samoense*. *Fish. Sci.* **70**, 342 – 344.
- Sugumar G, Nakai T, Hirata Y, Matsubara D, y Muroga K. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of necrosis of Japanese oyster. *Dis. Aquat. Org.* **33**, 111 – 118.
- Swanson RL, Williamson JE, de Nys R, Kumar N, Bucknall MP, y Steinberg PD. 2004. Induction of settlement of larvae of the sea urchin *Holpneustes purpurascens* by histamine from a host alga. *Biol. Bull.* **206**, 161 – 172.
- Swanson RL, de Nys R, Huggett MJ, Green JK, y Steinberg PD. 2006. *In situ* quantification of a natural settlement cue and recruitment of the Australian sea urchin *Holpneustes purpurascens*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **314**, 1- 14.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, y Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596 – 1599.
- Tegner MJ. 1996. The ecology of *strongylocentrotus franciscanus* and *Strongylocentrotus purpuratus*. In *Edible sea urchins: Biology and Ecology*. Lawrence JM. Ed. Elsevier Science B.V. Amsterdam. 321 p.
- Thiyagarajan, V., Harder T. y Quian, P. Y. 2003. Combined effects of temperature and salinity on larval development and attachment of the subtidal barnacle *Balanus trigonus* Darwin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **287**, 223-236.
- Thompson FL, Lida T, y Swings J. 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 403 – 431.

- Tomanek L. 2010. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species's biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *J. Exp. Biol.* **213**, 971 – 979.
- Tomanek L, y Somero GN. 1999. Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: implications for limits thermotolerance and biogeography. *J. Exp. Biol.* **202**, 2925 – 2936.
- Tomanek L, y Somero GN. 2002. Interspecific- and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus *Tegula*): implications for regulation *hsp* gene expression. *J. Exp. Biol.* **205**, 677 – 685.
- Thomson R, Macpherson HL, Riaza A y Birkbeck TH. 2005. *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot *Scophthalmus maximus* (L). *J. Appl. Microbiol.* **99**, 243 – 250.
- Toonen RJ, y Pawlik JR. 2001. Settlement of the gregarious tube worm *Hydroides dianthus* (Polychaeta: Serpulidae). I. Gregarious and nongregarious settlement. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **224**, 103 – 114.
- Toonen RJ, y Tyre AJ. 2007. If larvae were smart: a simple model for optimal settlement behavior of competent larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **349**, 43 – 6.
- Unabia CRC, y Hadfield MG. 1999. Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. *Mar. Biol.* **133**, 55 – 64.
- Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, y Ohwada K. 1998. A new approach to separate the Genus *Photobacterium* from *Vibrio* with RFLP patterns by *HhaI* digestion of PCR-amplified 16S rDNA. *Current Microbiol.* **36**, 171 – 174.
- Väitilingon D, Morgan R, Grosjean P, y Jangoux M. 2001. Effects of delayed metamorphosis and food rations on the perimetamorphic events in the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **262**, 41-60.
- Ventosa A, Nieto JJ, y Oren A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 504 – 544.
- Vera J, Alvarez R, Murano E, Slebe JC, y Leon O. 1998. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. *App. Env. Microbiol.* **64**, 4378 – 4383.
- Visser, M. E. 2008. Keeping up with with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change. *Proceeding of the Royal Society.* **275**, 649 – 659.
- Ward D, Ferris M, Nold S, y Bateson M. 1998. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **62**, 1353 – 1370.
- Webster NS, Smith LD, Heyward AJ, Watts JEM, Webb RI, Blackall LL, y Negri AP. 2004. Metamorphosis of a scleractinian coral in response to microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1213- 1221.

- Wendt, D. E. 1998. Effect of larval swimming duration on growth and reproduction of *Bugula neritina* (Bryozoa) under field conditions. *Biol. Bull.* **195**, 126-135.
- Whalan S, Ettinger-Epstein P, Battershill C, y de Nys R. 2008. Larval vertical migration and hierarchical selectivity of settlement in a brooding marine sponge. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **368**, 145 – 154.
- Wietz M, Jørgensen B, y Schramm A. 2010. Latitudinal patterns in the abundance of major marine bacterioplankton groups. *Aquat. Microb. Ecol.* **61**, 179 – 189.
- Wiklund T, y Dalsgaard I. 1998. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Dis. Aquat. Org.* **32**, 49 – 69.
- Wing SR, Botsford LW, Morgan LE, Diehl JM, y Lundquist CJ. 2003. Interannual variability in larval supply to populations of three invertebrate taxa in the northern California Current. *Est. Coastal and Shelf Sci.* **57**, 859 – 872.
- Wood E.J.F. 1952. The Micrococci in a marine environment. *J. Gen. Microbiol.* **6**, 205 – 210.
- Yhang JL, Satuito CG, Bao WY y Kitamura H. 2008. Induction of metamorphosis of pediveliger larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 using neuroactive compounds, KCl, NH₄Cl and organic solvents. *Biofouling.* **24**, 461 – 470.
- Yoon JH, Kang SJ, Lee MH, y Oh TK. 2007. Description of *Sulfitobacter donghicola* sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea, transfer of *Stayela guttiformis* Labrenz *et al.* 2000 to the genus *Sulfitobacter* as *Sulfitobacter guttiformis* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfitobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1788 – 1792.
- Yu X, He W, Li H, Yan Y, y Lin C. Larval settlement and metamorphosis of the pearl oyster *Pinctada fucata* in response to biofilms. *Aquaculture.* **306**, 334 – 337.
- Zaytsev O, Cervantes-Duarte R, Montante O, y Gallegos-Garcia A. 2003. Coastal upwelling activity on the Pacific Shell of the Baja California peninsula. *J. Oceanography.* **59**, 489 – 502.
- Zifeng W, Tian X, Shaojun P, Min L, y Haidong Y. 2009. Isolation and identification of bacteria associated with the surfaces of several algal species. *Chinese J. Ocean. Limn.* **27**, 487 – 492.
- Zhao M, Chen F, y Jiao N. 2009. Genetic diversity and abundance of Flavobacterial proteorhodopsin in China seas. *App. Env. Microbiol.* **75**, 529 – 533.